



TITLE:

コムギ・ヒストンH3遺伝子の細胞
周期S期特異的転写を規定するシス
調節エレメントの研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

大坪, 憲弘

CITATION:

大坪, 憲弘. コムギ・ヒストンH3遺伝子の細胞周期S期特異的転写を規定するシス調節エレメントの研究. 京都大学, 1994, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1994-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3075819>

RIGHT:

新	制
理	
855	
京大附図	

学位申請論文

大坪 憲弘

主論文

コムギ・ヒストン H3 遺伝子の細胞周期 S 期特異的転写
を規定するシス調節エレメントの研究

京都大学理学部植物学教室

大坪 憲弘

要旨

コムギ・ヒストン H3 遺伝子 (TH012) の細胞周期 S 期特異的発現に関与するプロモーター中のシス配列の同定を目的として、H3 プロモーターの下流に β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子コード領域を繋いだキメラ遺伝子及びその変異遺伝子を作製し、エレクトロポレーション法によりイネ培養細胞へ導入することにより形質転換培養細胞を得た。この形質転換細胞をアフィディコリンで処理することにより細胞周期を部分的に同調化し、薬剤除去後の H3/GUS mRNA 量の変動を S1 ヌクレアーゼ・プロテクション法で解析した。

まず、プロモーター領域を -1711、-908、-185 からそれぞれ +57 まで(転写開始点を +1 とする) 持つ 3 種類の H3/GUS キメラ遺伝子を用いて、イネ培養細胞内における遺伝子発現の S 期特異性にどのような変化が見られるかを調べた。その結果、上流域の配列が短くなるにつれ細胞周期全体を通しての発現量の低下が見られるものの、-185 よりも上流の H3 配列の欠失は S 期における細胞周期特異的な mRNA 量の変動パターンには影響しなかった。このことから、H3 遺伝子の -185 から +57 までのプロモーター領域に遺伝子発現の S 期特異性に関与するシス配列が少なくとも一つ存在することが明らかとなった。この領域にはこれまでに、植物ヒストン遺伝子のプロモーターに共通して見られるヘキサマー配列 (ACGTCA)、オクタマー配列 (CGCGGATC)、及びノナマー配列 (CATCCAACG) の 3 つが H3 遺伝子の転写調節に関わるシス配列として同定されており、これらが遺伝子発現の S 期特異性に関与している可能性が示唆された。

次に、上記の可能性を検証することを目的として、H3 プロモーター領域を -1716 から +52 まで持つ H3/GUS キメラ遺伝子 (-1716H3/GUS) を基本に -185 までのプロモーター領域に様々な欠失、置換を導入したキメラ遺伝子を作製し、これら変異遺伝子を持つ形質転換細胞を用いて遺伝子発現の S 期特異性を規定するシス配列の同定を試みた。その結果、ヘキサマー配列に 2 つの

塩基置換を導入した変異遺伝子と、ヘキサマー配列及びオクタマー配列の一部を含む 22 bp を欠失させた変異遺伝子を持つ細胞において、アフィディコリン除去後の S 期における mRNA 量の変動パターンには、はっきりとしたピークが現れなくなるという影響がみられたが、S 期特異性は完全には失われなかった。一方、オクタマー配列あるいはノナマー配列を含む領域のみに変異を導入した遺伝子や、これらシス配列以外のプロモーター領域に変異を導入した遺伝子については、S 期特異性への影響はみられなかった。これらの結果から、ヘキサマー配列が S 期特異性に関与していることが明らかとなったが、-186 の上流配列中にも同様の機能を持つ配列が存在し、これらが 185 までの領域に導入した変異の影響を打ち消す方向に働く可能性も示唆された。

上記の結果を踏まえた上で、ヘキサマー配列及びオクタマー配列が遺伝子発現の S 期特異性に関与しているかどうかをさらに詳しく調べるために、上流域を -184 まで持つ H3/GUS キメラ遺伝子 (-184H3/GUS) のヘキサマー配列及びオクタマー配列に塩基置換を導入した変異遺伝子について、同様の解析を行った。その結果、ヘキサマー配列及びオクタマー配列のいずれに変異を導入した場合にも、遺伝子発現の S 期特異性が完全に失われた。

以上の結果から、

- 1) ヒストン H3 遺伝子の細胞周期 S 期特異的な発現には、プロモーター領域の 184 から +52 までの領域があれば十分である、
 - 2) ヘキサマー配列及びオクタマー配列は H3 遺伝子の S 期特異的な転写調節に深く関与している、
 - 3) -185 の上流域にも S 期特異性を規定するシス配列が存在する、
- の 3 つの点が明らかとなった。

目次

	頁
I. 序論	1
II. 材料と方法	7
・ H3/GUS 遺伝子及びその変異遺伝子を持つプラスミドの作製	7
・ イネ培養細胞の形質転換	9
・ 形質転換培養細胞内の GUS 活性の測定	10
・ イネ培養細胞からのゲノム DNA の抽出	10
・ 導入遺伝子の Southern 法による解析	10
・ 細胞の培養及び細胞周期の同調化	11
・ [³ H]チミジンパルスラベル法による DNA 合成の検出	11
・ RNA の抽出と S1 法による mRNA の解析	12
・ Northern 法による mRNA の解析	13
III. 結果	14
III-1. H3/GUS キメラ遺伝子を持つ形質転換細胞株の確立	14
III-2. イネ形質転換細胞中での H3/GUS キメラ遺伝子の転写	15
III-3. 形質転換細胞における H3/GUS キメラ遺伝子の細胞周期 特異的な発現	16
III-4. H3/GUS 遺伝子の発現と DNA 合成の共役	18
III-5. プロモーター上流域の欠失変異遺伝子の解析	19
III-6. -1716H3/GUS キメラ遺伝子を用いた H3 プロモーターの 機能解析	19

III-7	184H3/GUS キメラ遺伝子を用いた H3 プロモーターの 機能解析	22
IV.	考察	25
IV-1.	植物ヒストン遺伝子の細胞周期 S 期特異的発現に必要な シス配列	25
IV-2.	ヘキサマー配列及びオクタマー配列を介した転写制御機構	29
IV-3.	H3 プロモーターにおける 2 元的な発現制御の可能性	32
IV-4.	H3 遺伝子の S 期特異的発現を調節する他のシス配列 について	33
IV-5.	植物における S 期特異的遺伝子発現の調節機構の多様性	37
	謝 辞	38
	参考文献	39
	図表	

I. 序論

ヒストンは、ヌクレオソーム構造の形成に必要な塩基性のタンパク質で、大部分の真核生物では、H1、H2A、H2B、H3、H4の 5 分子種から構成されている（総説 Hentschel and Birnstiel, 1980; Kedes, 1979; Maxon *et al.*, 1983; Osley, 1991, Robbins and Borun, 1967 参照）。高等真核生物では、細胞当たりの DNA 含量が多く、細胞周期の S 期に新たに合成される DNA をすべてパッケージングするために多量のヒストン蛋白が要求され、その需要を満たすために多数のヒストン遺伝子が存在する。その数は鳥類や哺乳類で 10 ～ 20 コピー、ウニやイモリでは 600 ～ 800 コピーに達する（Kedes, 1979; Stephenson *et al.*, 1981）。下等真核生物の場合、例えば酵母では 4 分子種のヒストン、H2A、H2B、H3、H4の遺伝子がそれぞれ 2 コピーずつしか存在しない（Smith, 1983）。5 分子種のヒストン遺伝子の配置や構造は、生物によって、また種によって大きく異なる。無脊椎動物では 5 分子種のヒストンがタンデムに繰り返して存在する（Kedes, 1979）のに対し、脊椎動物や下等真核生物では一部にクラスターをなすものがあるが、そのほとんどは不規則に分散する形で存在する（Maxon *et al.*, 1983）。5 分子種のヒストンのアミノ酸配列は進化上良く保存されているので、蛋白コード領域の塩基配列も、コドンの縮重はあるものの極めて良く保存されている。

高等真核生物のヒストンは、通常 3 つの大きなグループに分けられる。1 つは複製依存型（replication-dependent）ヒストンと呼ばれるもので、これをコードする遺伝子の転写および翻訳は通常細胞周期の S 期において DNA 合成と共役して起こる（Schümperli, 1986）。ヌクレオソーム構造の形成に関与するコアヒストン H2A、H2B、H3、H4 及びリンカーヒストンの H1 の大部分はこの種類に属する。2 つ目は複製非依存型で、細胞周期に関係なく一定に発現される。マウスの H3.3（Hraba-Renevey and Kress, 1989）などがこれに相当する。このタイプのヒストンは、分化の完了した非分裂細胞においてす

でクロマチン構造を形成している複製依存型のヒストンと置き換わることから、置換型とも呼ばれる。3 つ目が組織特異型で、鳥類や魚類の赤血球細胞に見られる H5（リンカーヒストンの一種）などがこれに相当する（Affolter *et al.*, 1987）。複製依存型ヒストンと、他の 2 者の間には、遺伝子編成や発現の様式に大きな隔たりがあることがわかっている。例えば、複製依存型ヒストン遺伝子がファミリーを形成し、ゲノムあたり複数の遺伝子コピーを持つのに対し、複製非依存型及び組織特異型ヒストンの遺伝子は 1 コピーのみであることが多い。

動物の複製依存型ヒストン遺伝子には、一般的なクラス II 遺伝子（RNA ポリメラーゼ II によって転写される遺伝子）とは異なる 2 つの大きな特徴がある。1 つはイントロンの欠除、もう 1 つは 3' 下流域に見られる特殊な構造である。一般にほとんどのクラス II 遺伝子がポリ（A）付加シグナル（AATAAA）を持ち、転写される mRNA の 3' 端がポリアデニル化されているのに対し、複製依存型ヒストンの mRNA にはポリ（A）鎖が付加されない。その代わりに 6 塩基のステムと 4 塩基のループからなるステム・ループ構造とその下流のプリン塩基に富む配列を持っており、これらが mRNA 前駆体の 3' 端形成に必須であることが示されている（Birnstiel *et al.*, 1985）。これとは対照的に、複製非依存型や組織特異型ヒストン遺伝子はイントロンを持ち、mRNA にもポリ（A）鎖が付加される点などは一般的なクラス II 遺伝子と共通している。

ヒストン生合成の細胞周期との共役は最初に Robbins と Borun によって示され（Robbins and Borun, 1967）、その後の解析でこの S 期特異的なヒストン蛋白の増減は mRNA 量の変動が直接反映されていることが明らかとなった（Wu and Bonner, 1981）。個々のクラスのヒストン遺伝子が多数単離され、共役の分子機構を探る手段が確立されることによって、ヒストン mRNA 量の細胞周期特異的な変動を制御する仕組みが徐々に解明されつつある。

動物においてヒストン遺伝子の大部分を占める複製依存型ヒストン遺伝子で

は、先にも述べたように細胞周期の進行にともなう mRNA 量の変動が DNA 合成と強く共役していることが知られている。このタイプに属するヒストン遺伝子の転写は、一般に細胞周期が G₀ または G₁ 期から S 期へと移行するにともない 3 ～ 5 倍に増加し、これに転写後調節が加わって S 期を通しての mRNA 量の増加は 15 ～ 30 倍にも及ぶ。そして S 期の終わりに選択的な分解が起こり、基底レベルに戻る。現在ではこのように細胞周期特異的な mRNA 量の変動は、転写レベルでの調節と転写後調節の大きく分けて 2 つの段階によって制御されていると考えられており、転写後調節はさらに mRNA 前駆体のプロセッシング効率、細胞質への輸送、安定性の制御の 3 つのステップに細分化される (Heintz, 1991; Marzluff and Pandey, 1988; Old and Woodland, 1984; Osley, 1991; Schümperli, 1988; Stein *et al.*, 1992)。

動物ヒストン遺伝子における S 期特異的な転写量の増加は、サブタイプ特異的な配列 (Subtype-Specific Consensus Sequence = SSCS) と、これに結合する転写因子によって引き起こされる事が *in vivo* あるいは *in vitro* の系を用いて示されている (Heintz, 総説 1991, Osley, 総説 1991 参照)。例えば、chicken 及び mammal の H1 プロモーターには 2 種類のサブタイプ特異的な配列 AC box (AAG/CAAACACAAA) と H1-specific homology box (GCACCAATCACA/CGCG-CGC/G) が存在し、核タンパク質 H1TF1 (H1-SF / AC box factor) と H1TF2 がそれぞれに配列特異的に結合することによって遺伝子発現の S 期特異性を規定することが報告されている (Dalton and Wells, 1988; LaBella *et al.*, 1989, Gallinari *et al.*, 1989)。また、human の H2B-specific promoter element である CC/TTNATT-TGCATAC 中の core octamer motif (ATTTGCAT) には OTF-1 (Oct1/NFIII) と呼ばれる核タンパク質が結合し、G₁ 期から S 期への移行にともなう転写の誘導に働いている (Fletcher *et al.*, 1987; LaBella *et al.*, 1988)。このほかにも human の H4-specific promoter element に結合する H4TF2 などが同定されているが (Dailey *et al.*, 1988)、S 期特異的な転写の誘導に働くという

直接の証拠は得られていない。これらの核蛋白質因子はいずれも細胞周期を通して存在量が一定であるらしいことから（一部に異説がある）、リン酸化などの蛋白自身の翻訳後修飾によって S 期特異的に DNA 結合能や活性化能、あるいは他の転写因子との相互作用を増大させ、その結果ヒストン遺伝子の S 期特異的な転写を誘導するのではないかとする説が現在のところ有力である（Heintz, 1991; Osley, 1991）。これらとは対照的に、動物ヒストン H2A 及び H3 遺伝子のプロモーター領域にはこれまでサブタイプ特異的な配列は見出されていない。

下等真核生物における興味深い例として挙げられるのは酵母（*S. cerevisiae*）の H2A-H2B Intercistronic region に存在する 2 種類の配列で、一方には正の制御因子が、他方には抑制因子が結合することから、細胞周期に依存した正負両方向への制御機構が共存するらしいと考えられている（Osley *et al.*, 1986）

以上に例を挙げたように、ヒストン遺伝子の細胞周期特異的発現に関するこれまでの報告は動物及び酵母のものがほとんどであった。遺伝子発現の S 期特異性に関する研究が、細胞周期の同調化という操作を必要とするため、その系が確立された動物や酵母の培養細胞を中心に行われてきたというのがそのおもな理由である。しかし、岩渕らの研究グループにおいて最初にコムギヒストン H3、H4 の遺伝子がクローン化されるに至って、高等植物に於いても cDNA 及び genomic clone がコムギ（Tabata *et al.*, 1984; Tabata and Iwabuchi, 1984; Tabata *et al.*, 1983; Yang *et al.*, 1991）、トウモロコシ（Chaubet *et al.*, 1986; Gigot *et al.*, 1987）、イネ（Wu *et al.*, 1989b）、アラビドプシス（Chaboute *et al.*, 1987; Gantt and Lenvik, 1991）、アルファルファ（Wu *et al.*, 1988）、パセリ（Wu *et al.*, unpublished）などから単離されている。このように 1 次構造上の特徴などに関する情報が蓄積されるにつれ、その転写調節機構や転写後調節のあり方が、動物のものと必ずしも一致しないというこ

とが明らかとなった。例えば、植物ヒストン遺伝子には動物ヒストン遺伝子 3' 下流域に共通した特徴であるステム・ループ構造が存在せず (Tabata and Iwabuchi, 1986)、その mRNA はポリアデニル化されている (Chaboute *et al.*, 1988; Chaubet *et al.*, 1988; Mikami and Iwabuchi, 1993; Wu *et al.*, 1989a)。また、植物ヒストン遺伝子のプロモーター領域には、動物に見られるサブタイプ特異的な配列と相同なものは見出されていない。一方、植物ヒストン遺伝子の発現にかかわる特有のシス配列や転写調節に関わる核蛋白質因子がこれまでに複数同定されており、これらが転写の活性化に働く例も示されている (Mikami and Iwabuchi, 総説 1993 参照)。このうちのいくつかは植物ヒストン遺伝子の分裂組織特異性に関与していることが示されている (Atanassova *et al.*, 1992; Kapros *et al.*, 1993; Lepetit *et al.*, 1992)、遺伝子発現の S 期特異性を制御するという直接的な証拠はまだ得られていなかった。同調系を用いた植物ヒストン遺伝子の解析では、わずかに三上らがタバコの培養細胞 BY-2 株の分裂同調系を用いて内在の H3 及び H4 mRNA 量の変動が DNA 合成と共役していることを見出だすにとどまっていた (Mikami and Iwabuchi, 1993)。このように動物ヒストン遺伝子の発現制御機構がヒストン遺伝子全般に適合しなくなった以上、ヒストン遺伝子の S 期特異的制御機構の解明には植物ヒストンを含めた総合的な解析や考察が必要不可欠となっている。

コムギ H3 遺伝子の 1 つである TH012 (Tabata *et al.*, 1984) は、種々の植物遺伝子の中でも特にその解析が進んでおり、5' 側からの欠損変異や塩基置換を導入した変異遺伝子の発現量の解析から、転写開始点上流 185 bp までの間に、少なくとも 3 つの正に働くシス配列、ヘキサマー配列 (ACGTCA)、オクタマー配列 (AATCCGCG=植物ヒストンの共通配列 CGCGGATC とは逆向きで 1 bp 異なる)、そしてノナマー配列 (CATCCAACG) が存在することが示されている (Nakayama *et al.*, 1989; Nakayama *et al.*, 1992) (図 1)。また、これらの配列に特異的に結合する核蛋白質としてヘキサマー配列

には HBP-1a 及び HBP-1b (Mikami *et al.*, 1987; Mikami *et al.*, 1989)、オクタマー配列には OBRF (Minami *et al.*, unpublished)、ノナマー配列には HBP-2 (Kawata *et al.*, 1988) が同定されている。この他にもヘキサマー配列及びオクタマー配列を含む領域に 1 本鎖特異的に結合する核蛋白質 ssDBP-1, ssDBP-2 や (Takase *et al.*, 1991a)、ノナマーを含む 38 bp の配列に結合する蛋白因子 WZF1 (Sakamoto *et al.*, 1993) も同定されている。これらのシス配列及び DNA 結合蛋白のいずれかが遺伝子発現の細胞周期特異性をもたらす可能性は早くから指摘されていた。

本研究では、この H3 遺伝子の S 期特異的な発現を制御するシス領域の同定を試みた。本論文の前半ではイネ培養細胞の形質転換およびこれら細胞を用いた同調培養系の確立と検証を中心に、後半では H3 プロモーター領域に様々な塩基の欠失、置換を導入した変異遺伝子の解析の結果、特定のシス配列が S 期特異性を規定するエレメントとして同定されたことについて述べる。また、シス配列とトランス因子との関わり合いや、分裂組織特異的発現に関するこれまでの知見との比較、さらには S 期特異的な遺伝子発現の制御の機構などについても考察する。

II. 材料と方法

H3/GUS キメラ遺伝子及びその変異遺伝子を持つプラスミドの作製

本研究で用いた H3/GUS キメラ遺伝子はいずれも岩渕らの研究グループによってクローン化されたコムギ・ヒストン H3 遺伝子 (TH012) のプロモーター領域に *Escherichia coli* 由来の β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子蛋白コード領域を結合して作製した。遺伝子の 3' 下流域にはノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子の転写終結配列を含む約 270 bp の断片を結合した。

p185H3/GUS (Nakayama *et al.*, 1992) は、-185 から +57 までの H3 プロモーター領域を持つ H3/GUS キメラ遺伝子 (-185H3/GUS) を pUC19 ベクターの *Hind*III/*Eco*RI サイトに導入したプラスミドである。このプラスミドを基本として H3 プロモーターの上流域をそれぞれ -1711、-908 まで持つ p1711H3/GUS 及び p908H3/GUS を作製した。p1711H3/GUS では H3 プロモーターの -185 上流配列の *Sac*I/*Hind*III 断片を、p908H3/GUS では *Av*alI/*Hind*III 断片をそれぞれ 5' 端に *Hind*III リンカーを結合して p185H3/GUS の *Hind*III サイトに導入した。このようにして、プロモーター上流域の長さの異なる 3 種類の H3/GUS キメラ遺伝子を得た。

H3 プロモーター領域に内部欠失、塩基置換変異を導入し、その影響を解析するための基本となる H3/GUS キメラ遺伝子 (-1716H3/GUS) を pUC118 ベクターの *Hind*III/*Eco*RI サイトに導入したプラスミド pNHGN1716 は以下の手順で作製した。まず、p185H3/GUS の *Hind*III/*Eco*RI 断片を pUC118 ベクターの *Hind*III/*Eco*RI サイトにクローン化し、pUC118-185H3/GUS を得た。このプラスミドをもとに、site-directed mutagenesis 法 (Kunkel, 1985) と図2A に示した 4 種類のプライマーを用いて塩基置換を導入して H3 プロモーター領域に *Acc*I (-128~-123)、*Xba*I (-92~-87)、*N*otI (-59~-52) の 3 種の制限酵素 サイトを、また GUS 遺伝子蛋白コード領域との結合サイトとな

る *Bam*HI サイト (+52~+57) を作製した。ダイデオキシ法で配列を確認した後、*Hind*III/*Bam*HI 断片を制限酵素で切断し回収した。この断片は H3 プロモーターの -185 から +52 の配列に相当する部分となる。次に、pBI221 (Jefferson, 1987) に由来する NOS 遺伝子転写終結配列を含む *Sac*I/*Eco*RI 断片と H3 プロモーター 1716 から -185 までの *Sac*I/*Hind*III 断片を *Eco*RI リンカーを介して結合した後、図2B の HKS* アダプターとともに pUC118 ベクターの *Hind*III サイトへ導入した。アダプター内の *Hind*III サイト及び両断片接合部の *Eco*RI サイトを制限酵素及び Klenow fragment での処理によって失活させた後、残ったマルチクローニングサイト中の *Hind*III サイトと *Eco*RI サイトに先の -185 から +52 の H3 プロモーター断片 (*Hind*III/*Bam*HI) と、pBI221 から新たに切り出した *Bam*HI/*Eco*RI 断片 (GUS コード領域と NOS 転写終結領域) を導入した。この方法で作製したプラスミドのうち、H3 プロモーター領域に変異を導入していないものを pNHGN1716wt、塩基置換によってプロモーター領域に 3 種の新たな制限酵素サイトを作り出したものを pNHGN1716mod と呼ぶ。pNHGN1716wt は、遺伝子上流側にも NOS 転写終結領域を持つ点と、H3 プロモーターと GUS コード領域との結合部位に制限酵素サイト (*Bam*HI) を持つ点が p1711H3/GUS とは異なる。プロモーター領域に変異を導入した遺伝子を持つプラスミドは pNHGN1716mod を基本に作製した。

H3 プロモーター領域の一部を内部欠失させた H3/GUS キメラ遺伝子を持つプラスミド pNHGN1716 Δ HS (-181/-158)、pNHGN1716 Δ SA (-161/-126)、pNHGN1716 Δ AX (-125/-91)、pNHGN1716 Δ XN (-88/-57)、pNHGN1716 Δ HN (-181/-57) は、pNHGN1716mod の H3 プロモーター領域の 5 つの制限酵素サイト、*Hind*III、*Sac*II、*Acc*I、*Xba*I、*Not*I のうち 2 つのサイト間の配列を制限酵素処理によって切り出した後、Klenow fragment で処理し、T4 DNA ligase を用いて再結合する事により作製した。また、ヘキサマー配列及びオクタマー配列に変異を導入した pNHGN1716Hex.M、

pNHGN1716Oct.M、pNHGN1716Hex.M-Oct.M は *HindIII*/*SacI* サイト間の配列を図2C に示した変異配列を持つ合成 DNAで置き換えることにより作製した。

H3 プロモーターの 185 上流配列を欠く H3/GUS 遺伝子と、その H3 プロモーター領域に変異を導入した H3/GUS キメラ遺伝子を持つプラスミド pNHGN184wt、pNHGN184mod、pNHGN184Hex.M、pNHGN184Oct.M、pNHGN184Hex.M-Oct.M は、pNHGN1716 系プラスミドのそれぞれに対応するものから *SacI*/*HindIII* 間の配列 (-1716~-185) を制限酵素処理によって切断、除去した後、末端を Klenow fragment で処理し、T4 DNA ligase を用いて再結合することにより作製した。

なお、以下の本文中及び図中においては pNHGN 系プラスミドの持つそれぞれの H3/GUS 遺伝子を「1716wt」、「184Hex.M」のように簡略化して表記する。

イネ培養細胞の形質転換

対数増殖期のイネ培養細胞 (Oc, Baba *et al.*, 1986) を経塚らの方法によりプロトプラスト化し (Kyojuka *et al.*, 1987)、形質転換に用いた。エレクトロポレーション法により上記の H3/GUS キメラ遺伝子を持つプラスミドとハイグロマイシン耐性 (*Hmr*) 遺伝子を持つプラスミド (pSHI943, Bilang *et al.*, 1991) を同時に導入し、*Hmr* の形質を持つカルスを経塚らの方法に従い選抜した (Kyojuka *et al.*, 1990; Shimamoto *et al.*, 1989)。さらに GUS 活性をもつ細胞を histochemical assay 法 (Jefferson, 1987) で選抜し、解析に用いた。

形質転換培養細胞内の GUS 活性の測定

5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-gluc) を基質とする histochemical assay 法による形質転換培養細胞の GUS 活性の検出と、4-methylumbelliferil- β -D-glucuronide (MUG) を基質とする fluorometric assay 法による GUS 活性の測定は、Jefferson らの方法に従った (Jefferson, 1987)。

イネ培養細胞からのゲノム DNA の抽出

Southern 法及び [³H]チミジンによるパルスラベル法での解析に用いたゲノム DNA の抽出には Mettler らの方法 (Mettler, 1987) を改良して用いた。湿重量 400 mg 程度の細胞に破碎バッファー (50 mM Tris-HCl pH8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.25 M Sucrose) を加え、氷冷しながらテフロンホモジナイザーで破碎する。EDTA 20 mM と Sodium N-Lauroyl Sarcosinate 1% を加え室温で 30 分置いた後、フェノール処理 2 回、エーテル処理 3 回を行い、エタノール沈殿する。回収した DNA は CsCl を用いた密度勾配遠心 (436,000 $\times g$, 6 時間) により精製した。

導入遺伝子の Southern 法による解析

上記の方法によって、遺伝子導入を行っていない培養細胞及び形質転換細胞から抽出したゲノム DNA 0.45 μg を HindIII または EcoRI でそれぞれ切断し、1% アガロースゲル電気泳動で展開した。ゲルに展開した DNA 断片は 0.4 M NaOH と VacuGene Vacuum Blotting System (Pharmacia LKB) を用いてナイロンメンブレン (Hybond N+, Amersham) 上にブロッティングし、³²P 標識した p185H3/GUS の HindIII/EcoRI 断片と常法 (Maniatis et al., 1982)

に従いハイブリダイズさせた。形質転換細胞に導入された H3/GUS キメラ遺伝子のコピー数は同時に泳動したコピー数マーカーとの比較により決定した。シグナルの強さの測定には AMBIS Radioanalytic Imaging System (AMBIS Systems) を用いた。

細胞の培養及び細胞周期の同調化

形質転換培養細胞の液体培養は 2,4-D (2 mg/l)、myo-inositol(100 mg/l)、thiamine-HCl (0.4 mg/l)、及び 3% (w/v) sucrose を含む 100 ml の MS 培地を用いて、26℃ 暗所で振盪培養 (100 往復/分) することによって行った。1 週間毎に、細胞塊の小さいものを選抜しながら 3 ml ずつ継代し、最低 3 カ月間継代を続けたものを実験に用いた。

細胞周期の同調化は以下の手順で行なった。継代後 6 日目の培養細胞 15 ml (packed cell volume) をアフィディコリン 10 µg/ml を含む 300 ml の MS 培地に移し、上記と同様の条件で培養する。24 時間培養した後、500 ml のアフィディコリンを含まない新しい MS 培地入りのメディウム瓶に細胞を取り、攪拌子を用いて攪拌しながら 10 分間洗浄する。洗浄操作を 2 回繰り返した後、MS 培地 700 ml に細胞を分散して 300 ml コルベン 7 本に分取し、通常の継代と同じ条件で振盪培養する。薬剤除去直後から 1 時間毎に細胞を取り、300 mg を [³H]チミジンでのパルスラベルに用い、残りの細胞を RNA 抽出用のサンプルとして液体窒素で凍結し、-80℃ で保存する。

[³H]チミジンパルスラベル法による DNA 合成の検出

薬剤除去後の各時間において集めた細胞のうち湿重量 300 mg 程度を 2 ml の MS 培地に再懸濁した後、[³H]チミジン 20 µCi を加える。ペリスタポンプとバスツールピペットを用いて無菌的に、かつ穏やかに送気することにより攪

拌しながら 26℃ で 20 分間標識し、速やかに培地を除去して液体窒素で凍結する。この細胞から Southern 法に用いる場合と同様の手順でゲノム DNA を抽出し、10 µg を Wattmann DE81 フィルターに載せ、液体シンチレーションカウンターによる放射活性の測定に用いた。

RNA の抽出と S1 法による mRNA の解析

全 RNA の抽出と S1 法による解析は中山らの方法に従った (Nakayama *et al.*, 1989)。高比活性 1 本鎖 DNA プローブは、M13系ファージを基本とする 3 種類の 1 本鎖鋳型 DNA (mpHG, mpHG2, mpHm) をもとにプローブ全体を均一にラベルする方法で合成した。-1711H3/GUS、-908H3/GUS、-185H3/GUS 遺伝子から転写される mRNA を検出するプローブの鋳型となる mpHG は、p185H3/GUS の *HindIII/EcoRI* 断片を M13mp19 のマルチクローニングサイトに導入した後、1 本鎖 DNA を調製して得た。mpHG2 は pNHGN 系プラスミドの H3/GUS キメラ遺伝子から転写される mRNA を検出するための鋳型で、pNHGN1716wt の *HindIII/EcoRI* 断片を用いて mpHG と同様の方法で作製した。また、Hm^r mRNA を検出するプローブの鋳型となる mpHm は、Hm^r 遺伝子の蛋白コード領域に由来する *BamHI/HindIII* 断片を M13mp18 のマルチクローニングサイトに導入して得た。H3/GUS mRNA に対するプローブの合成反応には 2 種類の合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いた。プライマー A (5'-CGCGCTGATACCAGACG-3') は GUS コード領域中の +118 から +134 (H3 プロモーターの転写開始点を +1 とする) に相当し、プライマー B (5'-GGCCACAGGCCGTCGAG-3') は +273 から +289 に相当する (図3 参照)。プライマー A は転写開始点確認のためのシーケンス反応に用いた。Hm^r 遺伝子から転写される mRNA に対するプローブの合成には M4 プライマー (TAKARA) を用いた。H3/GUS キメラ遺伝子及び Hm^r 遺伝子から転写される mRNA は、泳動後乾燥させたポリアクリルアミドゲ

ル上のシグナルに相当する放射活性を AMBIS Radioanalytic Imaging System によって直接測定し、定量した。

Northern 法による mRNA の解析

1 レーン当たり 10 μ g の全 RNA を 2.1 M ホルムアルデヒド-1% アガロースゲル電気泳動で展開し、50 mM NaOH をトランスファー溶液としてナイロンメンブレン (Hybond N+, Amersham) にブロッティングした。RNA プロットは ^{32}P で標識した DNA プローブと常法 (Maniatis *et al.*, 1982) に従いハイブリダイズさせた。プローブの作製には H3 遺伝子 (TH012) の蛋白コード領域に由来する 301 bp の *Eco*T14I 断片を用いた。メンブレン上の H3 mRNA に相当するシグナルの放射活性は AMBIS Radioanalytic Imaging System によって直接測定し、定量した。

III. 結果

III-1. H3/GUS キメラ遺伝子を持つ形質転換細胞株の確立

本研究でははじめに、コムギ・ヒストン H3 遺伝子の細胞周期特異的発現を解析するための培養細胞株及び解析系の確立と検証を行った。解析の基盤としてイネ Oc 細胞の形質転換系を用いた理由には、1) エレクトロポレーションによる遺伝子導入の系が確立されており、形質転換効率が高いことと、2) コムギと同じ単子葉植物由来であるため、双子葉植物であるタバコの系に比べ、より忠実な機能解析が期待できることなどが挙げられる。

イネ細胞中での H3 プロモーター活性および発現の細胞周期特異性について解析を進めるために、まずコムギ・ヒストン H3 遺伝子 (TH012) プロモーター領域と GUS 遺伝子の蛋白コード領域をつないだ 3 種類のキメラ遺伝子 (図 3A; -1711H3/GUS, -908H3/GUS, -185H3/GUS) を持つプラスミドをそれぞれ pSHI943 プラスミドとともにエレクトロポレーション法によってイネ Oc 培養細胞に導入した。pSHI943 は、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターにハイグロマイシン耐性遺伝子蛋白コード領域をつないだキメラ遺伝子を持つプラスミドで、選抜マーカーとしての機能と、細胞周期に依存しない転写の対照としての機能を合わせ持っているものである。Hmr の形質を持った形質転換細胞コロニーを選抜し、培養を続けた後、さらに histochemical assay 法 (Jefferson, 1987) により GUS 活性を持つコロニーを選抜して以下の fluorometric assay 法により検定した。

表 1 に示されているように、単一細胞由来のカルスの GUS 活性は 50~13,600 p mol 4MU (4-methyl-umbelliferone) /min/mg protein となった。このように、形質転換細胞株ごとに GUS 活性のばらつきが見られるものの、H3 プロモーターの上流域が短くなるに伴い GUS 活性が減少する傾向が見られた。例えば -1711H3/GUS キメラ遺伝子に比べ、-908H3/GUS キメラ遺伝子では

1/2、-185H3/GUS キメラ遺伝子では 1/14 であった。このことは H3 プロモーターの -186 の上流にはプロモーター活性を増幅させるシス配列（エンハンサー）が存在することを示している。

以降の実験においてはそれぞれの遺伝子について2種類の形質転換細胞株を用いた。1711-9、908-20、185-33 は平均的な GUS 活性を持つ細胞株、1711-12、908-21、185-35 は同種の形質転換細胞の中でも比較的強い GUS 活性を持つ細胞株である。Southern 法による解析から、これらの形質転換細胞はゲノム（2n）当たり1コピーから3コピーの H3/GUS キメラ遺伝子を持つことがわかった（図4）。コピー数が必ずしも GUS 活性の強さを反映しないのは、導入されるゲノム上の位置によって position effect などの影響を受けるためと考えられる。またレーン 3 から 7 にかけて見られるいくつかの弱いシグナルは島本の報告（Shimamoto, 1991）にあるように、導入に際してプラスミドが断片化してゲノムに組み込まれたものに由来している。これは遺伝子を直接導入する方法で得た形質転換植物などではしばしば見られる現象であり、実際にはインタクトな状態で染色体に組み込まれた遺伝子のみが発現しているものと考えられる。これら6種の形質転換細胞株は液体培養の状態で継代し、H3 プロモーターの機能解析に用いた。

III-2. イネ形質転換細胞中での H3/GUS キメラ遺伝子の転写

形質転換細胞中で H3/GUS キメラ遺伝子が正確に転写されているかどうかを調べるために、まず S1 nuclease protection 法（以下 S1 法と略記）によって H3/GUS キメラ遺伝子の転写開始点を決定した（図5）。それぞれの形質転換細胞において、わずかに +6 の A 残基からの転写が見られるものの、多羽田らが報告しているように H3 遺伝子（TH012）本来の転写開始点（+1 の A 残基）からの強い転写が確認された（Tabata *et al.*, 1984）。このことは、このキメラ遺伝子における H3 プロモーターからの転写がその下流に結合した

GUS コード領域に影響されないことを示している。1711-9 細胞株において、GUS 活性が比較的高いにも関わらず（表1、5967 p mol 4MU/min/mg protein）弱いシグナルしか観察されないのは（図3、レーン 5）、液体培養における細胞の状態が不安定で生理的な活性が低下していたためと考えられる。

III-3. 形質転換細胞における H3/GUS キメラ遺伝子の細胞周期特異的な発現

イネゲノム中に導入された H3/GUS キメラ遺伝子が細胞周期特異的に発現するかどうかをアフィディコリン処理による同調培養系を用いて調べた。アフィディコリンは DNA ポリメラーゼ α の特異的な阻害剤で、DNA 合成を可逆的に阻害し（Ikegami *et al.*, 1978）、これによって細胞周期の進行をブロックすることができる（Pedrall-Noy *et al.*, 1980; Sala *et al.*, 1982）。長田らはこの薬剤が細胞分裂を高率で同調し得ることをタバコの培養細胞（BY-2）を用いて確認している（Nagata *et al.*, 1982）。また、三上らはこの同調系を用いてタバコの H3 及び H4 遺伝子が細胞周期特異的に発現することを示した（Mikami and Iwabuchi, 1993）。本研究では、この同調系における薬剤処理の方法を改善して、イネ培養細胞での部分的同調化に成功した。

継代後 6 日目のイネ培養細胞は増殖がほぼ定常状態に達しており、細胞周期は G₁ 期（もしくは G₀ 期）において停止していると考えられる。この細胞をアフィディコリン 10 μ g/ml を含む新鮮な MS 培地に移して 24 時間培養することにより、細胞周期が G₁ 期と S 期の境界まで進行した細胞を蓄積させた。薬剤の除去は通常、メッシュ上に集めた細胞に新鮮な培地を通して洗うという方法で行うが、本研究においては集めた細胞を培地入りのメディウム瓶中で攪拌しながら薬剤を強制的に除去するという方法を採用した。Oc 細胞の場合、この方法を用いることによって同調率が最大 5 割程度向上し、薬剤除去後の細胞分裂指数（M. I.= mitotic index）は 17 時間目で 30 に達した（データ省略）。

この値はタバコ培養細胞（BY-2）を用いた場合の値、M. I. = 約 40 に比べてややその効率が落ちてはいるが、液体培地中の細胞塊あたりの細胞数がタバコの場合 10 数個程度であるのに対し、イネが 100 個以上であることから薬剤の浸透・除去効率を考えるとこれ以上の同調率は期待できないかもしれない。ただし、以下の実験で示すように、この値は mRNA レベルでの S 期特異的な変動を検出するには十分なものであると判断した。

以上の同調系を用いて、薬剤除去後の H3/GUS キメラ遺伝子発現の S 期特異的な変動を GUS 活性を指標に捉えることを試みた（表2）。薬剤除去後の液体培養細胞中の GUS 活性は、同じ細胞株を寒天培地で培養した場合に比べて高くなっている（表1 と 2 を比較参照）。これは、導入された GUS 遺伝子が、活発に分裂している細胞でより強く発現していることを示唆している。しかし、薬剤除去後（S 期）の GUS 活性は 4 時間目までの間に最大 1.7 倍程度の上昇が見られるものの（表2）、明確な活性ピークは見られなかった。これは GUS 蛋白自体が非常に安定であることに起因しているものと考えられる（Jefferson *et al.*, 1986）。このような結果を考えた場合、この実験目的のためには GUS 活性の変動を調べることは適当ではなく、より直接的な方法として mRNA 量の変動を解析することが必須であると結論した。

形質転換培養細胞内における薬剤除去後の H3/GUS mRNA 量の変動は S1 法によって測定した。この方法を用いた理由としては、1) Northern 法に比べて検出能力及び定量性に優れること、2) 単一の遺伝子からの mRNA のみを確実に検出できること、の 2 点が挙げられる。図6A 及び 6B は 1711-12 細胞株における H3/GUS mRNA 量の変動を S1 法により解析した結果を示している。mRNA 量はアフィディコリン除去後 1 時間で約 10 倍となり（図6A、H3/GUS レーン 2 及び図6B、1 時間目）、3 時間目までの間に急速に減少するが（図6A、H3/GUS レーン 4 及び図6B、3 時間目）、内部対照として測定した Hm^r mRNA は 1 時間目に培地交換の影響と思われるわずかな上昇が見られるものの（図6A、control レーン 2 及び図6B、1 時間目）、その後はほぼ一定の値を

示した。このような形質転換細胞内における H3/GUS mRNA の解析から、コムギ H3 遺伝子の発現も動物や酵母に於いて報告されているように、mRNA レベルでの S 期特異的な制御を受けていると結論された。

遺伝子発現の S 期特異的な変動の指標の 1 つとして、イネ内在の H3 mRNA 量の変動を Northern 法で測定した (図6C)。その結果、イネ H3 mRNA 量の変動は、ピークが 2 時間目にあることと 6 時間目までの間に緩やかに減少することの 2 点を除けば H3/GUS mRNA 量の変動と基本的には類似のパターンを示した。ここに見られた違いは 1 つには検出法の違いにその原因があるものと考えられる。すなわち、S1 法が単一の H3/GUS キメラ遺伝子の発現を検出しているのに対し、Northern 法では内在の全ての H3 遺伝子の発現を同時に検出しているため、ピークの出方や増加/減少の速度に差が現れたものと思われる (考察参照)。

III-4. H3/GUS 遺伝子の発現と DNA 合成の共役

遺伝子の発現が細胞周期と同調していることを確かめるため、導入した H3/GUS キメラ遺伝子の発現と DNA 合成との関係を調べた (図7)。薬剤除去後の DNA 合成量の変動は $[^3\text{H}]$ チミジンを用いたパルスラベル法によって検出した。 $[^3\text{H}]$ チミジンの取込みは薬剤除去後 1 時間で最大となり、2 時間目には基底レベルまで戻った (図7A 及び 7B、0 ~ 2 時間)。H3/GUS mRNA 量の変動もこれとよく似たパターンを示している。Northern 法の結果 (図6C) も併せて考えると、形質転換細胞中での H3/GUS キメラ遺伝子の発現は DNA 合成と共役した形で進行すると結論される。

このように、アフィディコリンを用いた同調系と S1 法による mRNA 量変動の解析を組み合わせることにより、遺伝子発現の S 期特異的な変動パターンを検定できることがわかった。以下ではこの系を用いた H3/GUS キメラ遺伝子の発現解析を通して、S 期特異性を規定するシス調節配列の同定を行った。

III-5. プロモーター上流域の欠失変異遺伝子の解析

遺伝子発現の S 期特異性に H3 プロモーターの配列がどの程度上流まで必要なのかを調べる目的で、H3 プロモーターの 5' 上流域について長さの異なる 3 種類の H3/GUS キメラ遺伝子 (-1711H3/GUS、-908H3/GUS、-185H3/GUS) を作製し、これら遺伝子の形質転換細胞中における発現パターンを mRNA 量の変動を指標に比較した。図8 はそれぞれの遺伝子について 2 種類ずつの形質転換細胞株を用いて行った、同調培養系及び S1 法での解析結果を示している。薬剤除去後の mRNA 量の変動は全ての細胞株においてほぼ同様の S 期特異的なパターンを示した(図8)。この結果は、H3 プロモーターの -185 から +57 までの領域に H3 遺伝子発現の S 期特異性を規定する配列が少なくとも 1 つ存在することを強く示唆している。1711-9 細胞株において mRNA 量の増加率が低く、減少速度も緩やかなのは、細胞自体の増殖活性が低下していたことが主たる原因と思われる。このことは、表2で示した GUS 活性にも反映されていたことから明らかである。

III-6. -1716H3/GUS キメラ遺伝子を用いた H3 プロモーターの機能解析

上記の実験において、コムギ・ヒストン H3 遺伝子の -185 から +57 までのプロモーター領域には遺伝子発現の細胞周期特異性を規定するシス配列が存在することが示された。本論文の冒頭で述べたとおり、H3 プロモーターの -185 までの領域にはヘキサマー、オクタマー、ノナマーの 3 つのシス配列と、これらに結合する核蛋白質因子がすでに同定されており、これらのシス配列およびトランス因子が遺伝子発現の S 期特異性に関与している可能性が考えられていた(図1 参照)。この可能性について調べるために、-185 までのプロモーター領域に様々な欠失、塩基置換を導入した変異遺伝子を作製し、導入した変異が遺伝子発現の S 期特異性にどのような影響を与えるかを調べた。

これらの解析においては、変異遺伝子の作製や変異導入後の配列の検証を容易にする目的で新たな H3/GUS キメラ遺伝子を作製した（図9）。1716wt（-1716H3/GUS 遺伝子）では、キメラ遺伝子の転写産物の解析を容易にするために、転写活性の高い -1716 から +52 までの H3 プロモーター領域を用いた。また、このキメラ遺伝子では、ベクター内の他の遺伝子プロモーターからの転写が H3/GUS キメラ遺伝子の発現に影響する可能性を排除する目的で、キメラ遺伝子の上流にも NOS 転写終結配列を導入した。1716mod は、上記 1716wt の -185 までの H3 プロモーター領域にこれまでに見出されているシス配列以外の領域に合計 5 bp の塩基置換を導入して *AccI*、*XbaI* 及び *NotI* の 3 つの制限酵素サイトを新たに作製した変異遺伝子である。この遺伝子をもとに、制限酵素サイト間の配列を欠失させた遺伝子や、変異を含む合成オリゴヌクレオチド（図2C）で置き換えた変異遺伝子を作製した。これら変異遺伝子を既述した方法でイネ培養細胞へ導入し、得られた形質転換細胞を用いて S 期における mRNA 量の変動を解析した。なおこの解析では、実験区ごとのデータの信頼性を高めるため、アフィディコリン除去後の各時間点における H3/GUS mRNA 量を Hm^r mRNA 量で補正した値について、細胞周期との関係を調べた。

図10B に見られるように、これまでに見出されているシス配列以外の H3 プロモーター領域に 5 bp の塩基置換を導入した 1716mod（mod 10-5 細胞株）に於いても、先の実験（図8）で見た正常な H3/GUS キメラ遺伝子の場合と同様、S 期における急激な H3/GUS mRNA 量の増加と減少が見られた。すなわち、1 時間目でおおよそ 5 倍に増加し、その後 1/10 程度まで減少した。これは、導入した変異が H3 プロモーター活性の細胞周期特異性に影響を与えないことを示している。これに対し、ヘキサマー配列とオクタマー配列の一部を含む 22bp を欠失させた 1716 Δ HS（ Δ HS 27-1 細胞株）や、ヘキサマー配列に 2 bp の塩基置換を導入した 1716Hex.M（Hex.M 7-6 細胞株）では、mRNA 量の変動は小さい上に、薬剤除去直後の mRNA 量の急激な増加は見ら

れず、はっきりとしたピークも現れなかった。すなわち、ヘキサマー配列とそれを含む狭い領域に変異が起こった場合にのみ、H3 プロモーターの S 期特異性が影響を受ける事が明らかとなった。一方、オクタマー配列に変異を導入した 1716Oct.M (Oct.M 19-2 細胞株) では、明確な S 期特異性の変動パターンを示した。このように、ヘキサマー配列に変異を導入した場合に細胞分裂に伴う mRNA 量の変動パターンに影響が見られたことは、ヘキサマー配列が S 期特異的発現を規定するシス配列であることを強く示唆した。

つぎに、ノナマー配列及びその下流域の欠失変異、さらに、3 つのシス配列全てを含む領域を欠失させた変異遺伝子について調べた。ここでの 1716mod からの S 期特異的発現については先の実験とは別の細胞株である mod 10-2 を用いた。上述の場合と同様、1716mod から転写される mRNA 量の変動は細胞周期に依存したパターンを示した (図11B)。さらにノナマー配列を含む 33 bp を欠失させた 1716 Δ AX (Δ AX 4-4 細胞株)、ノナマー配列と TATA box の間の 30 bp を欠失させた 1716 Δ XN (Δ XN 14-9 細胞株) に於いても、遺伝子発現の細胞周期特異性には正常遺伝子のそれとは大きな違いはなかった。つまり、ノナマー配列を含む TATA box 上流の -125~-58 の配列は、H3 プロモーター活性の細胞周期特異性を規定する上で必ずしも必要でないことが示唆された。また、非常に興味深いことは 1716 Δ HN (Δ HN 6-5 細胞株) における mRNA 量の変動で、この場合にはヘキサマー、オクタマー、ノナマーの 3 つのシス配列を全て含む 123 bp を欠失しているにもかかわらずその発現パターンは明瞭な S 期特異性を示した。この結果は以下の 2 つの可能性を示唆するものである。1 つは、S 期特異性を規定するシス領域が -57 から +52 までの配列中に存在する可能性であり、もう 1 つは -186 の上流配列中にも特異性を規定する配列が存在する可能性である。しかし、前者の場合はヘキサマー配列に変異を導入した 1716Hex.M 及び 1716 Δ HS でその発現の S 期特異性が損なわれたことと矛盾する。従って、この特異性を規定するシス領域はヘキサマー配列付近にあるが、1716 Δ HN のように広範囲にわたる配列を欠失させた場

合にはその働きを補う領域が -186 上流に存在すると考えられる（考察参照）。

上記の実験に見られた薬剤除去後の特異的な mRNA 量の変動が DNA 合成と共役したものであること、及びヘキサマー配列付近に変異を導入した場合に見られた影響が同調の不完全さによるものではないことを DNA 合成量の変動を同時に見ることによって確認した（図12）。図12 において示されているように、mod 10-5、ΔHS 27-1、Hex.M 7-6 のいずれの細胞株に於いても [³H]-チミジンの取り込みは薬剤除去後1時間で急激に立ち上がり、その後減少するというパターンを示した。このことは、変異遺伝子をもつ形質転換細胞での DNA 合成は正常であることを示しており、従ってヘキサマー配列付近に導入した変異により遺伝子発現の S 期特異性が損なわれることが明白となった。

III-7 -184H3/GUS キメラ遺伝子を用いた H3 プロモーターの機能解析

これまでの実験結果から、H3 プロモーターのヘキサマー付近の配列が H3 遺伝子の S 期特異性を規定していることが示されるとともに、186 より上流にもこの特異性に関与する領域が存在している可能性も示された。つまり H3 遺伝子の S 期特異的発現には複数のシス領域が関与しているらしいと考えられた。これら複数の領域それぞれが S 期において機能していると考えた場合、個々のシス配列への変異導入による影響が明瞭に現れないことが予想される。このことから、解析の対象となる領域を限定する必要があると考えられた。ここでは、-185 の下流域に存在する S 期特異性を規定するシス配列をより明確にする目的で、-184H3/GUS キメラ遺伝子を用いてこれまでと同様の解析を行なった。

この実験に用いた 184wt 及びその変異遺伝子の構造は図13 に示した。184wt は 1716wt の 185 よりも上流域の *SacI-HindIII* 断片を持たない遺伝子である。この実験では、1716H3/GUS 遺伝子の解析において S 期特異性

に關与していることが示されたヘキサマー配列の他に、ヘキサマーとオクタマーの一部を欠失した 1716 Δ HS で S 期特異性に影響が見られたことを考慮して、オクタマー配列を変異導入の対象とした。184wt 及びその変異遺伝子はそれぞれ常法に従ってイネ培養細胞へ導入した。得られた形質転換細胞を用いて、これら導入遺伝子から転写される mRNA 量が S 期においてどのように変動するか、また、-185 上流配列の有無によって H3 プロモーター領域に導入した変異の与える影響に違いが見られるかを調べた。

まず、H3 プロモーター領域に変異を持たない 184wt と、シス配列以外の領域に 5 bp の塩基置換を導入した 184mod について、形質転換細胞内での発現をそれぞれ 2 種類の細胞株を用いて比較した (図14B)。いずれの場合に於いても、薬剤除去後 1 時間で mRNA 量が最大となり、3 時間目までの間に急激に減少するという S 期特異性を示すパターンが得られた。この変動が DNA 合成と共役していることは、同時に行った [3 H]チミジンの取り込み実験において確認した。また、184wt と 184mod を比較する限り、薬剤除去後の mRNA 量の変動パターンには違いが見られなかった (図14B)。このことは、シス配列以外の領域に変異を導入しても H3 プロモーター活性の S 期特異性は失われていないことを示しており、また 184wt も上流域を 1.7 kbp まで持つキメラ遺伝子と同様の発現制御を受けるものと考えられる。

つぎに、ヘキサマー配列あるいはオクタマー配列に変異を導入した遺伝子について調べた。図15B に見られるように、いずれの変異遺伝子を持つ形質転換細胞株に於いても、DNA 合成は S 期特異的な変動を示しているにもかかわらず、184wt や 184mod で見られた mRNA 量の特異的な変動が見られなかった。-1716H3/GUS 遺伝子の解析で得られた結果と比較した場合、-185 の上流配列の有無による発現パターン違いは特に 184Oct.M において明瞭であったが (図15B、184Oct.M 7、184Oct.M 34 及び図10B、Oct.M 19-2 参照)、184Hex.M に於いても、上流域の配列を持つ場合に比べてよりはっきりとした S 期特異性の喪失が観察された (図15B、184Hex.M 1、184Hex.M 42 及び図

10B、Hex.M 7-6 参照)。以上の結果から、ヘキサマー配列及びオクタマー配列が遺伝子発現の細胞周期特異性を規定するシス配列であること、及び 185 上流配列にもこの特異性に関与する領域が存在することが明らかとなった。

さらに、ヘキサマー配列、オクタマー配列のそれぞれの配列に同時に変異を導入した場合の影響についても調べた(図16B)。この変異遺伝子を持つ 2 つの形質転換細胞株でも、一方の配列に変異を導入した場合と同様、mRNA 量の変動は DNA 合成と平行せず H3 プロモーター活性の細胞周期特異性は失われる結果となった。この結果は図10B で示した実験における 1716 Δ HS (ヘキサマー配列とオクタマー配列の一部を欠失)の実験結果を支持するものであった。また、この場合も上流域の配列を持たない時に変異の効果がより強く現れた(図16B、184Hex.M-Oct.M 12、184Hex.M-Oct.M 17 及び図10B、 Δ HS 27-1 参照)。

IV. 考察

IV-1. 植物ヒストン遺伝子の細胞周期 S 期特異的発現に必要なシス配列

本研究は、コムギ・ヒストン H3 遺伝子の細胞周期 S 期特異的発現を規定するシス配列の同定を目的として、様々な変異を導入した H3 プロモーター領域を GUS コード領域に結合したキメラ遺伝子を用いてイネ培養細胞発現系で解析したものである。本研究の成果は、1) H3 プロモーターの S 期特異的機能には -184 から +52 までの領域があれば十分である (図14B)、2) この領域に存在する ヘキサマー配列及びオクタマー配列の 2 つのシス配列が S 期特異性に関与している (図15B 及び 16B)、3) H3 プロモーターの -185 上流域にも、上記 2 つのシス配列の働きを補う配列が存在する (図10 及び 15B)、の 3 点に要約できる。

本研究に於いてヒストン遺伝子の S 期特異的発現に関与するシス配列として同定されたヘキサマー配列及びオクタマー配列は、これまでに単離された多くの植物ヒストン遺伝子のプロモーター領域に見出されている (Mikami and Iwabuchi, 1993; Nakayama and Iwabuchi, 1993)。特に、オクタマー配列はクローン化された全ての植物ヒストン遺伝子のプロモーター領域に見出されており、S 期特異性に関与するシス配列である可能性が早くから指摘されていた。このヘキサマーとオクタマーの 2 つの配列はしばしば対をなす 1 つの連続した配列として植物ヒストン遺伝子プロモーターに保存されていることが三上らによって報告されている (Mikami and Iwabuchi, 1993)。この配列はタイプ I・エレメントと呼ばれ、コムギ、トウモロコシ、アルファルファ、バセリの H2B、H3、H4 遺伝子に見出されている (表 3)。タイプ I・エレメントはこれまでにヒストン遺伝子以外の植物遺伝子では見つかっていないことから、この 18 bp の配列が 1 つのユニットとしてコムギ・ヒストン H3 遺伝子の S

期特異的発現を規定している可能性が指摘されていた。本研究の結果は、ヘキサマー配列、オクタマー配列のいずれもが遺伝子の S 期特異的発現に必要であることを示しており、上記の可能性を強く支持するものである。一方、植物ヒストン遺伝子の中にはそのプロモーター中にヘキサマー配列を持たないものも存在することから、遺伝子発現の S 期特異的な調節にはオクタマー配列を介した少なくとも 2 種類の方法があると考えられる。冒頭で述べたように、動物ヒストン遺伝子ではプロモーター中にサブタイプ特異的な配列が存在し、遺伝子発現の細胞周期特異性がそれぞれの配列に結合する異なる核蛋白質（転写制御因子）によってもたらされることが知られている。このような例からも、植物ヒストン遺伝子の S 期特異的発現を調節する複数の制御機構が存在する可能性が考えられるであろう。

ヘキサマー配列は植物ヒストン遺伝子のプロモーター領域以外にも、発生段階あるいは組織に特異的な発現や、ホルモン及びストレスによる誘導に関わる様々な植物遺伝子プロモーター中に存在している (Mikami and Iwabuchi, 総説 1993 参照)。また、オクタマー配列はいくつかの DNA 複製に依存しないタイプの植物ヒストン遺伝子にも見出されている (Chaubet *et al.*, 1992; Huh *et al.*, unpublished)。このことから、これらの配列が遺伝子発現の S 期特異性とは関係のない別の機能にも関わっている可能性が指摘されている。このような例としては human の H2B 遺伝子プロモーターに存在するサブタイプ特異的な配列が挙げられる。この H2B プロモーター中の CC/TTNAT-TTGCATAC の共通配列内には、コアとなるオクタマー配列 (ATTTGCAT; 本研究で言うオクタマー配列とは異なる) が存在し、これが S 期特異的遺伝子発現に関与していることが知られている。この配列は U1 及び U2 snRNA 遺伝子や、SV40 エンハンサー、immunoglobulin 遺伝子のプロモーター／エンハンサーなど、その発現が細胞周期に依存しない遺伝子上流域にも見つかっている (総説 Osley, 1991 参照)。このような知見からも、ある特定のシス配列が異なる複数の制御機構に関与することは十分予想される。

ノナマー配列に関しては、これを含む 30 bp を欠失させた変異遺伝子 Δ AX が正常な S 期特異性の発現パターンを示したことから（図11）、H3 遺伝子の細胞周期に依存した発現には直接的には関与しないことを示した。また、Lepetit らはトウモロコシの H4 (C7) プロモーター中に存在するノナマー配列が、DNA の複製に依存しない発現に関与していることをタバコ葉肉細胞プロトプラストのトランジェントアッセイ系を用いて示しており (Lepetit *et al.*, 1993)、このことから、ノナマー配列が S 期特異性に関与しないシス配列であることが示唆される。しかし一方では、トウモロコシ H3 (C4)、H4 (C7) 遺伝子プロモーター領域を用いた *in vivo* footprinting 実験から、これらプロモーター中のノナマー配列を含む領域に細胞分裂特異的に核タンパク質が結合することが Brignon らによって示されており (Brignon and Chaubet, 1993)、例えばこのような核タンパク質が、遺伝子発現の S 期特異性に付加的な働きを持つ可能性などについては興味を持たれる。

H3 プロモーターに内部欠失変異を導入した H3/GUS キメラ遺伝子の解析において、ヘキサマー、オクタマー、ノナマーの全ての配列を欠いた 1716 Δ HN が S 期特異的な発現パターンを示したことから、上記シス配列の他に 185 上流の H3 配列中にも遺伝子発現の S 期特異性に関わる配列の存在が推定されたが（図11）、このことは 185 上流配列の有無によって、ヘキサマー配列、オクタマー配列に導入した変異の与える影響に顕著な差が見られたことから明らかである。表4 は -1716H3/GUS 遺伝子と 184H3/GUS 遺伝子の S 期特異的な発現に対してプロモーター変異が及ぼす影響を比較したものであるが、プロモーター上流域を -184 までしか持たない -184H3/GUS 遺伝子では、ヘキサマー配列、オクタマー配列のいずれに変異を導入した場合も発現の S 期特異性が失われたのに対し、上流域を -1716 まで持つ -1716H3/GUS 遺伝子ではヘキサマー配列に変異を導入した場合に弱い影響が見られるものの、依然として S 期特異的な発現パターンを示した。また、ヘキサマーとオクタマーの両配列に変異を導入した遺伝子として 1716 Δ HS と 184Hex.M-Oct.M

比較した場合にも、上流域の有無によって発現の S 期特異性に差が見られた。これらの結果は、-185 上流域にも S 期特異性を規定するシス配列が存在し、実際の H3 遺伝子の発現制御に於いても機能している可能性を示唆するものである。これに基づいて -185 上流域の配列を検索したところ、転写開始点上流 350 bp までの間に、ヘキサマーやオクタマーの類似配列が 3 箇所見出された（図17）。このうち特に下流側の 2 つ（-289~-268 と -269~-246）は、ヘキサマーを中心とした配列がよく保存されていた。これらの類似配列はヘキサマー配列及びオクタマー配列と同様な機能を持ったシス配列であろうと考えている。-1716H3/GUS の変異遺伝子を用いた実験において、ヘキサマー配列に 2 bp の塩基置換を導入した遺伝子（1716Hex.M）及びヘキサマー配列を含む 22 bp を欠失させた遺伝子（1716 Δ HS）でその発現の S 期特異性が損なわれたにも関わらず（図10）、これを含む 123 bp を欠失させた変異遺伝子（1716 Δ HN）ではこの特異性に影響が見られなかった（図11）。この一見矛盾した結果を解釈するために、図18 に示したモデルを考えている。

このモデルでは、ヘキサマー配列及びオクタマー配列と TATA ボックスを含む転写開始点付近（コア・プロモーター領域）との距離に着目している。ヘキサマー、オクタマーの両配列が遺伝子発現の S 期特異性を規定するシス配列であり、コア・プロモーターとの距離がこれら配列の機能に重要であると考えた場合、1716Hex.M や 1716 Δ HS のように上流域の配列の位置が大きく変化しないような変異を持つ遺伝子の場合、ヘキサマー、オクタマー類似配列とコア・プロモーターとの距離が大きく、S 期特異的発現をもたらすには不十分である。これに対して、123 bp を欠失した 1716 Δ HN ではこれら類似配列がちょうど本来のヘキサマー、オクタマー配列の位置へ移動するため、遺伝子の発現に強い S 期特異性が見られたと考える。実際の遺伝子発現制御においては、TATA ボックスを中心とした基本転写因子複合体と、ヘキサマー配列、オクタマー配列に結合する転写因子あるいはその複合体との間の相互作用に対して、図18 に示したような距離的要因が影響すると予想される。

以上に述べたように、コムギ・ヒストン H3 遺伝子の S 期特異的発現は、ヘキサマー配列、オクタマー配列、及び上流域に存在する両者の類似配列によって調節されていることが強く示唆される。著者らはこれまでに、1716mod をもとに上流域のヘキサマー、オクタマー類似配列を含む広い領域に変異を導入した新たな H3/GUS 遺伝子の作製を行っており、すでにこれらの遺伝子を導入した形質転換細胞株を得ている。これらを用いた解析によって、-186 よりも上流に存在するヘキサマー、オクタマー類似配列の機能と H3 遺伝子本来の転写制御の仕組みをさらに明らかにすることができるであろう。

VI-2. ヘキサマー配列及びオクタマー配列を介した転写制御機構

遺伝子の転写活性化は一般に、遺伝子上のシス配列に種々の転写調節因子が特異的に相互作用することによって引き起こされることが知られている (Sassone-Corsi and Borrelli, 1986)。転写調節因子がシス配列を介して転写を活性化するメカニズムとしては、1) 転写調節因子自体の存在量の増加、2) 結合する転写調節因子あるいはそれらの複合体の構成変化、3) 転写調節因子の翻訳後修飾による DNA 結合能、他の因子との相互作用、転写活性化能の増大、などが考えられる。前項で述べた human の H2B 遺伝子に見られるサブタイプ特異的な配列に結合する因子として OTF-1 (Oct1/NFIII) が同定されているが、これに対する特異抗体を用いた解析や、 $[^{32}\text{P}]$ オルトリン酸でのバルスラベル/免疫沈降などの実験から、S 期特異的な転写の活性化は OTF-1 の合成速度や存在量、あるいは DNA 結合能には依存せず、蛋白のリン酸化による転写因子それ自身の活性化能の増大によるものであることが示されている (Heintz, 1991)。

コムギ・ヒストン H3 遺伝子プロモーター中のヘキサマー配列に特異的に結合する核蛋白質として、HBP-1a 及び HBP-1b の 2 種類が最初に同定され (Mikami *et al.*, 1987; Mikami *et al.*, 1989)、サウスウェスタン・スクリー

ニング法によってこれらをコードする cDNA クローンが得られた。いずれも bZIP と呼ばれる塩基性アミノ酸に富む領域とロイシン・ジッパー構造を持つ転写因子の特徴を持っており (Tabata *et al.*, 1989; 1991)、コムギ H3 遺伝子の転写因子であることが示されている (Nakayama *et al.*, unpublished; Ito *et al.* unpublished)。また、上記の HBP-1a、1b とは異なる bZIP 型蛋白因子をコードする cDNA も複数得られている。これらの蛋白因子はその結合特異性と構造的特徴から HBP-1a と HBP-1b の 2 つのサブファミリーを形成していることが示されており、それぞれに属する蛋白因子がサブファミリー内でヘテロダイマーを形成しうることも確認されている (Mikami *et al.*, submitted)。最近の研究においては、HBP-1a 及び HBP-1b の認識配列はそれぞれ CCACGT、ACGTCA と、タイプ I・エレメント上でオーバーラップしながらも微妙に異なっているらしいことも明らかになっており、前者を Hex-a、後者を Hex-b と呼んで区別している (Mikami and Iwabuchi, 1993)。

HBP-1a 及び HBP-1b が H3 遺伝子の S 期特異的な転写調節に関与している可能性を示す実験結果がこれまでにいくつか得られている。まず、コムギ発芽時の細胞周期の自然同調系における mRNA 量変動パターンの解析から、HBP-1a、HBP-1b 遺伝子の発現は H3 遺伝子の発現と平行しており、DNA 合成とも共役した発現制御を受けていることなどが明らかとなっている (Minami *et al.*, 1993)。次に、HBP-1a 及び HBP-1b の構造解析から、この因子内にリン酸化されうる部位がいくつか見出されており (Takase and Iwabuchi, 1993)、精製した HBP-1b がアルカリフォスファターゼ処理によって DNA 結合能を失うことや (Takase *et al.*, 1991b)、アラビドプシスのカゼインキナーゼ II が HBP-1a 及び HBP-1b を *in vitro* でリン酸化できることが示されているほか (Meshi *et al.*, Takase *et al.*, unpublished)、HBP-1b には真核生物の細胞周期制御に関わる cdc 2 キナーゼによってリン酸化される領域が見出されており、この領域が Goldfish の cdc 2 キナーゼでリン酸化されることが明らかになっている (Takase *et al.*, unpublished)。これら

のことは、細胞周期に依存したこれら蛋白因子のリン酸化／脱リン酸化によって DNA 結合能や蛋白自身の機能が変化している可能性を示唆している。さらに最近、コムギ培養細胞の核抽出物中のヘキサマー配列に特異的に結合する複数の核蛋白質の相対的な量比が細胞周期を通して変化することが示された (Minami *et al.*, unpublished)。同様に Brignon らはトウモロコシ H3(C4) 及び H4 (C7) 遺伝子の *in vivo* footprinting の結果から、この遺伝子のプロモーター中に存在するヘキサマー配列（及びオクタマー配列）に蛋白が結合することや、結合のパターンが細胞の増殖活性によって異なることを示しており (Brignon and Chaubet, 1993)、ヘキサマー配列とそこに結合する蛋白因子が S 期特異的な遺伝子発現に関わっている可能性を示すものと言えるだろう。上記の結果を総合してヘキサマー配列を介した HBP-1a 及び HBP-1b による S 期特異的転写調節機構を考えた場合、これら因子の量的変化及び構造変化、さらには蛋白複合体の構成の変化のいずれもが転写調節の重要な要因となっていることが想像される。オクタマー配列に関してもごく最近、配列特異的に結合する核蛋白質 (OBRF) が同定されたほか、上に述べたような S 期に DNA 結合能の増加する因子の存在も確認されており (Minami *et al.*, unpublished)、タイプ I・エレメント全体では非常に複雑な調節機構が働いているものと予想される (図19A 参照)。

上記の事柄を総合して考えられる、タイプ I・エレメントを介した S 期特異的転写活性化のモデルを図19B に示した。S 期における転写活性化は、ここに結合する蛋白因子それぞれの存在量や、構造の変化（リン酸化等）、あるいは HBP-1a、-1b ファミリー内でのヘテロダイマーの組み合わせの変化などによって、最終的に形成される蛋白複合体の構成と機能が S 期特異的に変化することによって引き起こされると考える。

IV-3. H3 プロモーターにおける 2 元的な発現制御の可能性

S 期特異的に発現するヒストン遺伝子のプロモーター領域と GUS 遺伝子蛋白コード領域とのキメラ遺伝子を導入したトランスジェニック植物において、プロモーター活性と細胞分裂との関係を調べた例がいくつか報告されている。これらの報告の中で興味深いのは、植物体の分裂組織の他に、一部の非分裂組織でも導入した遺伝子の発現が観察されていることである。例えば、アラビドプシスの H4 (A748) プロモーターは、タバコ及びアラビドプシスのいずれの植物体に於いても分裂組織と非分裂組織の両方で活性を示しているほか (Atanassova *et al.*, 1992; Lepetit *et al.*, 1992)、同様の結果はアルファルファの H3 (ALH3-1.1) プロモーター及びコムギの H3 (TH012) プロモーターでも得られている (Kaprois *et al.*, 1993; Terada *et al.*, 1993)。これらの実験結果はヒストン・プロモーターのある領域が複製依存型と非依存型の両方の発現を制御できることを示唆するものである。本研究の実験結果に於いても、S 期特異性を失った変異遺伝子の発現が mRNA のレベルでも検出されたことから (図15 及び 16 参照)、遺伝子の発現の強さを調節する仕組みと細胞周期特異性を調節する仕組みがそれぞれ独立しており、細胞周期に依存した発現と依存しない発現の両方を担うことができるとも考えられる。このことは、5' 欠失変異遺伝子の解析において、上流域の配列が短くなるに伴い発現量の絶対値が減少するにも関わらず、発現の S 期特異性は影響されないことから支持される (表1 及び図8 参照)。

現時点では、S 期特異的発現の解析結果と分裂組織特異的発現のそれとは必ずしも一致していない。寺田らは、本研究で用いたコムギ H3 プロモーターのヘキサマー配列及びオクタマー配列へ様々な塩基置換を導入して作製した-185 H3/GUSキメラ遺伝子の分裂組織での発現に対する影響を調べている (Terada *et al.*, submitted)。その結果、オクタマー配列単独かあるいはヘキサマー配列とオクタマー配列の両者に同時に変異を導入した場合に根端分裂組織での

GUS 活性の減少が見られ、ヘキサマー配列にのみ変異を導入した場合には影響が見られなかった。この結果は、イネ・プロトプラストのトランジェント発現系での解析結果や、形質転換培養細胞の GUS 活性比較の結果などとも一致するが (Terada *et al.*, 1993)、本研究における -184H3/GUS 遺伝子の解析で、ヘキサマー配列に変異を導入した場合に S 期特異的発現が見られなくなるという実験結果とは異なっている。これらの結果に対する矛盾のない説明として、次のようなことが考えられる。すなわち、形質転換細胞の分裂同調系における解析が純粋に S 期特異的な遺伝子発現の変化を検出しているのに対し、トランスジェニック植物体及びトランジェント発現系における実験結果は H3 プロモーターが持っている細胞周期特異的発現と非特異的発現の 2 元的機能を同時に検出していたと解釈すれば説明できるであろう。実際、GUS は安定な酵素であることから、基底レベルでの発現の蓄積が mRNA 量の変動で見られたような S 期における変化を覆い隠してしまう可能性が考えられる。本研究に於いても、薬剤除去後の S 期特異的な遺伝子発現を GUS 活性の増大という形では確認できなかったことからこの可能性は支持されると考えている。

以上の事柄を考えると、トランスジェニック植物の分裂組織における遺伝子発現パターンの解析をもとに細胞周期特異性を論ずることは難しいものと考えられる。この点、本研究で得られた結果は信頼に耐え得るものと言えるであろう。

IV-4. H3 遺伝子の S 期特異的発現を調節する他のシス配列について

細胞内でのヒストン mRNA 量を調節する要素としては、転写量、プロセッシング効率、安定性、及び細胞質への輸送の 4 つが考えられる (Heintz, 1991; Marzluff and Pandey, 1988; Osley, 1991, Schümperli, 1986)。遺伝子上のシス配列に関わる制御機構として転写調節が最も重要であることは疑う余地がなく、本研究に於いて S 期特異的発現制御に関わる配列として同定したヘキ

サマー配列及びオクタマー配列も、直接の証拠は得られていないものの、転写量を細胞周期特異的に調節する働きをもつものと考えられる。その根拠としては以下のようなことが挙げられる。例えば、本研究で用いた -184H3/GUS キメラ遺伝子から転写される mRNA はヒストン遺伝子に由来する配列を 52 b しか持たない。この領域が仮に mRNA の転写後調節に関わっていたとしても、ヘキサマー配列及びオクタマー配列に変異を導入した場合に mRNA 量の S 期特異的変動が見られなくなることを説明できないからである。従って、本研究の一連の結果はコムギ・ヒストン H3 遺伝子の発現制御のうち、転写調節の段階のみを反映したものとするのが妥当であろう。実際の H3 遺伝子の発現制御にはさらに、ポリアデニル化を含めた mRNA の 3' 端形成や、mRNA の安定化に関与するシス領域の存在が予想される。本研究での解析に用いた遺伝子は H3 プロモーターと GUS とのキメラ遺伝子であり、今回得られた一連の結果から H3 遺伝子の転写後調節について考察することは難しいが、植物ヒストン遺伝子に於いても 3' 下流域の配列が mRNA 量の調節に関わっている可能性は十分考えられる。この点に関してすでに我々は、植物ヒストン遺伝子に特有のある共通配列が mRNA の 3' 端形成に関与していることを明らかにしている（後述）。

動物ヒストン遺伝子 3' 下流域にはステム・ループとこれに続くプリン残基に富んだ配列からなる特有の構造が存在し、mRNA の 3' 端形成に関与している（Blrnstiel *et al.*, 1985; Gick *et al.*, 1987）。このステム・ループ構造は 3' 端形成だけではなく、mRNA の代謝と細胞質への輸送にも関与している。例えば、細胞周期が S 期から G₂ 期に移行したり、DNA 合成が阻害されると、ヒストン mRNA の急激な分解が起こるが（Graves and Marzluff, 1984; Morris *et al.*, 1991; Sittman *et al.*, 1983）、この特異的分解にはステム・ループ構造が必須であることが知られている（Levine *et al.*, 1987; Pandey and Marzluff, 1987）。また、ステム・ループ構造を欠いている時は転写された mRNA が核内で蓄積することも示されている（Sun *et al.*, 1992）。このよう

に、動物ヒストン遺伝子の 3' 下流域にあって転写されるこの特異な配列は細胞周期における mRNA 量の調節に関わっている。これに対して、植物ヒストン mRNA の 3' 端はポリアデニル化されており (Chaboute *et al.*, 1988; Chaubet *et al.*, 1988; Mikami and Iwabuchi, 1993; Wu *et al.*, 1988; Wu *et al.*, 1989a)、上記のようなステム・ループ構造は存在しない (Gigot, 総説 1988 参照)。ヒストン mRNA のポリアデニル化は、この他にも細胞周期に依存しないものや (Old and Woodland, 総説 1984 参照)、酵母 (Fahrner *et al.*, 1980)、テトラヒメナ (Bannon *et al.*, 1983) などの下等真核生物において報告されている。転写後調節による遺伝子発現の制御に関しては、動物ヒストン遺伝子転写産物に見られる 3' プロセッシング機構が発生初期の急速な細胞分裂に対応するために進化上獲得された機能であり、これ以外のカテゴリーに属する生物種に於いては転写後調節による S 期特異的な mRNA 量の制御は存在しないだろうとする立場もある (Osley, 1991)。しかし、植物ヒストン遺伝子の 3' 下流域の配列の比較から、一般的なポリ (A) シグナルである AATAAA 配列が存在しないことや (Joshi, 1987)、3' 端形成やポリアデニル化に関与すると思われる植物ヒストン遺伝子に特有の共通配列が見出されていることから (Mikami and Iwabuchi, 1993; Nakayama *et al.*, 1989)、植物ヒストン遺伝子独自の転写後調節機構が存在する可能性は否定できない。例えば Chaubet らは、トウモロコシ H3 及び H4 mRNA のポリ (A) サイトから 25 ヌクレオチド上流に相当する遺伝子上の配列に、A/GATG (G) AAATG かなる共通配列が存在することを示した (Chaubet *et al.*, 1988; Phillips *et al.*, 1986)。この配列はアラビドプシス (Chaboute *et al.*, 1988)、アルファルファ (Wu *et al.*, 1988; Wu *et al.*, 1989a)、イネ (Wu *et al.*, 1989b)、コムギ (Mikami and Iwabuchi, 1993)、にも見出されている。さらに著者らは、コムギの H3 (TH012) 遺伝子に存在するこの配列に変異を導入した場合に mRNA の正常な 3' 端形成が阻害されることを形質転換ヒマワリを用いた *in vivo* の系で明らかにしており、植物ヒストン mRNA に特有の 転写後調節機

構が存在する可能性を示した (Ohtsubo and Iwabuchi, 参考論文 3, submitted)。

上記のような転写後調節にも関わる問題の 1 つとして、本研究における H3/GUS キメラ遺伝子と内在のイネ H3 遺伝子の S 期における発現パターンの違いが挙げられる。図6 の実験に於いて、導入した H3/GUS キメラ遺伝子と内在のイネ H3 遺伝子では薬剤除去後の mRNA 量の変動に違いが見られたが、これについては2つの理由が考えられる。1つは mRNA の検出に用いた実験系とプローブの性質の違い、もう1つは先に述べた転写後調節の違いである。Northern 法で用いたプローブは H3 遺伝子の蛋白コード領域の配列であり、従って検出された転写産物はイネ内在の全ての H3 遺伝子の転写産物の和である。これに対し、形質転換細胞における H3/GUS キメラ遺伝子の発現検定は GUS コード領域の配列を含んだプローブを用いて S1 法で行ったため、導入した H3/GUS キメラ遺伝子の転写産物のみを特異的に調べることができる。Raghavan らはいくつかの H3 遺伝子が細胞周期に依存しない発現をすることを明らかにしており (Raghavan, 1989; Raghavan and Olmedilla, 1989)、また、Kapros らは2つのタイプのアルファ H3 遺伝子が細胞周期依存性に関して異なる発現パターンを示すことを報告している (Kapros *et al.*, 1992)。これらのことから考えても、蛋白コード領域に由来する特異性の低いプローブを用いた Northern 法においてはいくつかの異なる制御を受けるヒストン遺伝子の転写産物を同時に検出しているものと考えられる。一方、先に述べた A/GATG (G) AAATG 配列の有無によって mRNA の安定性が異なり、その結果、薬剤除去後の mRNA 量の変動パターンに差が生じることが考えられる。H3/GUS キメラ遺伝子では、この配列は GUS のコード領域及び 3' 下流域で置き換えられているため、H3 遺伝子本来のものとは異なった制御を受けている可能性が示唆される。

以上の事柄を総合的に見ると、H3 プロモーター領域以外のシス配列にもヒストン遺伝子の S 期特異的発現に関わるものが存在すると考えられ、制御機

構の全体像を知る意味でも、今後これら 3' 領域の配列を含めた総合的な解析が必要とされるであろう。著者らはすでに、pNHGN1716 遺伝子をもとに、GUS コード領域と NOS 転写終結配列の間に H3 遺伝子の 3' 領域の配列を導入したキメラ遺伝子を作製し、これらの遺伝子を導入した形質転換培養細胞を得ている。mRNA の蓄積量や S 期での変動のパターンにどのような変化がみられるかを解析することによって、植物ヒストン遺伝子の発現における転写後調節の重要性をさらに明らかにすることができるであろう。

IV-5. 植物における S 期特異的遺伝子発現の調節機構の多様性

植物に於いてはヒストン以外にもいくつかの S 期特異的な発現をする遺伝子が見出されている。例えば伊藤らは、ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) の培養細胞に於いて G₁/S 期に発現する遺伝子として 2 種類の cDNA クローン (*cyc02*, *07*) を報告している (Ito *et al.*, 1991)。リン酸飢餓による同調系 (Amino *et al.*, 1983) と Northern 法による G₁ 期から S 期にかけての mRNA 量変動パターンの解析から、*cyc07* が S 期開始時期にのみ特異的に発現するのに対し、*cyc02* は増殖停止状態 (G₀) と S 期開始時期の両方で発現し、G₁ 期通過時には消失することを報告している。また、イネ及びニチニチソウに於いては、DNA ポリメラーゼ δ の補助因子として知られる PCNA の cDNA が単離されている。さらにこの遺伝子が S 期特異的に転写されること (Kodama *et al.*, 1991) や、分裂組織特異的に発現することが示されているが、アフィディコリン添加によって DNA 合成を阻害してもその発現は影響を受けないことが報告されている (Kosugi *et al.*, 1991)。このように G₁/S 期に発現する遺伝子であっても、その制御機構は異なっている可能性がある。今後、植物における細胞周期の進行、制御に関わる遺伝子が多数単離され、解析が進展することによってその全体像が明らかにされることであろう。

謝 辞

本研究を進めるに当たり、直接ご指導くださいました植物学教室岩淵雅樹教授、中山卓哉助手、そのほか貴重な助言、討論を頂きました植物工学研究所島本功博士、寺田理枝博士、植物学教室分子植物学講座の皆さん及び諸先輩に深く感謝いたします。

なお、本研究において -1711H3/GUS 遺伝子及びその 5' 欠失変異遺伝子に関する解析は京都大学理学部植物学教室中山卓哉助手及び植物工学研究所島本功博士、寺田理枝博士との共同研究です。

参考文献

- Affolter, M., Côté, J., Renaud, J. and Ruiz-Carrillo, A.** Regulation of histone and β^A -globin gene expression during differentiation of chicken erythroid cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3663-3672 (1987)
- Amino, S., Fujimura, T. and Komamine, A.** Synchrony induced by double phosphate starvation in a suspension culture of *Catharanthus roseus*. *Physiol. Plant.* **59**, 393-396 (1983)
- Atanassova, R., Chaubet, N. and Gigot, C.** A 126 bp fragment of a plant histone gene promoter confers preferential expression in meristems of transgenic *Arabidopsis*. *Plant J.* **2**, 291-300 (1992)
- Baba, A., Hasezawa, S. and Syono, K.** Cultivation of rice protoplasts and their transformation mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. *Plant Cell Physiol.* **27**, 463-471 (1986)
- Bannon, G.A., Calzone, F.J., Bowen, J.K., Allis, C.D. and Gorovsky, M.A.** Multiple, independently regulated, polyadenylated messages for histone H3 and H4 in *Tetrahymena*. *Nucl. Acids Res.* **11**, 3903-3917 (1983)
- Billang, R., Iida, S., Peterhans, A., Portrykus, I. and Paszkowski, J.** The 3'-terminal region of the hygromycin-B-resistance gene is important for its activity in *Escherichia coli* and in *Nicotiana tabacum*. *Gene* **100**, 247-250 (1991)
- Birnstiel, M.L., Busslinger, M. and Strub, K.** Transcription termination and 3' processing: The end is in site! *Cell* **41**, 349-359 (1985)
- Brignon, P. and Chaubet, N.** Constitutive and cell-division-inducible protein-DNA interactions in two maize histone gene. *Plant J.* **4**, 445-457 (1993)
- Chaboute, M.E., Chaubet, N., Clément, B., Gigot, C. and Philipps, G.** Polyadenylation of histone H3 and H4 in dicotyledonous plants. *Gene* **71**, 217-223 (1988)

- Chaboute, M.E., Chaubet, N., Philipps, G., Ehling, M. and Gigot, C.** Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H3 and two histone H4 genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **8**, 179-191 (1987)
- Chaubet, N., Chaboute, M.-E., Clément, B., Ehling, M., Philipps, G. and Gigot, C.** The histone H3 and H4 mRNAs are polyadenylated in maize. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1295-1304 (1988)
- Chaubet, N., Clément, B. and Gigot, C.** Genes encoding a histone H3.3-like variant in *Arabidopsis* contain intervening sequences. *J. Mol. Biol.* **225**, 569-574 (1992)
- Chaubet, N., Philipps, G., Chaboute, M.-E., Ehling, M. and Gigot, C.** Nucleotide sequences of two corn histone H3 genes. Genomic organization of the corn histone H3 and H4 genes. *Plant Mol. Biol.* **6**, 253-263 (1986)
- Dailey, L., Roberts, S.B. and Heintz, N.** Purification of the human histone H4 gene-specific transcription factors H4TF-1 and H4TF-2. *Genes Develop.* **2**, 1700-1712 (1988)
- Dalton, S. and Wells, J.R.E.** A gene-specific promoter element is required for optimal expression of the histone H1 gene in S-phase. *EMBO J.* **7**, 49-56 (1988)
- Fahrner, K., Yarger, J. and Hereford, L.** Yeast histone mRNA is polyadenylated. *Nucl. Acids Res.* **8**, (1980)
- Fletcher, C., Heintz, N. and Roeder, R.G.** Purification and characterization of OTF-1, a transcription factor regulating cell cycle expression of a human histone H2b gene. *Cell* **51**, 773-781 (1987)
- Gallinari, P., La Bella, F. and Heintz, N.** Characterization and purification of H1TF2, a novel CCAAT-binding protein that interacts with a histone H1 subtype-specific consensus element. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1566-1575 (1989)
- Gantt, J.S. and Lenvik, R.** *Arabidopsis thaliana* H1 histones. Analysis of two members of a small gene family. *Eur. J. Biochem.* **202**, 1029-1039 (1991)
- Glick, O., Krämer, A., Vasserot, A. and Birnstiel, M.L.** Heat-labile regulatory factor is required for 3' processing of histone precursor mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 8937-8940 (1987)

- Gigot, C.** In *Architecture of Eukaryotic Genes*. (Kahl, G., ed.). Weinheim: Verlag Chemie, pp. pp. 229-240 (1988)
- Gigot, C., Chaubet, N., Chaboute, M.E., Ehling, M. and Philipps, G.** Nucleotide sequences of two histone H3 and H4 genes of corn. Further insight into the structure and organization of the histone genes in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **25**, 235-247 (1987)
- Graves, R.A. and Marzluff, W.F.** Rapid, reversible alterations in histone gene transcription and histone mRNA levels in mouse myeloma cells. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 351-357 (1984)
- Heintz, N.** The regulation of histone gene expression during the cell cycle. *Biochim. Biophys. Acta* **1088**, 327-339 (1991)
- Hentschel, C.C. and Birnstiel, M.L.** The organization and expression of histone gene families. *Cell* **25**, 301-313 (1980)
- Hraba-Renevey, S. and Kress, M.** Expression of a mouse replacement histone H3.3 gene with a highly conserved 3' noncoding region during SV40- and polyoma-induced G0 to S-phase transition. *Nucl. Acids Res.* **17**, 2449-2461 (1989)
- Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Oguro, M., Nagano, H. and Mano, Y.** Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase- α . *Nature* **275**, 458-460 (1978)
- Ito, M., Kodama, H. and Komamine, A.** Identification of a novel S-phase-specific gene during the cell cycle in synchronous cultures of *Catharanthus roseus* cells. *Plant J.* **1**, 141-148 (1991)
- Jefferson, R.A.** Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 387-405 (1987)
- Jefferson, R.A., Burgess, S.M. and Hirsh, D.** β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **83**, 8447-8451 (1986)
- Joshi, C.P.** Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. *Nucl. Acids Res.* **15**, 9627-9640 (1987)

- Kapros, T., Bögre, L., Németh, K., Bakó, L., Györgyey, J., Wu, S.C. and Dudits, D.** Differential expression of histone H3 gene variants during cell cycle and somatic embryogenesis in alfalfa. *Plant Physiol.* **98**, 621-625 (1992)
- Kapros, T., Stefanov, I., Magyar, Z., Ocsovszky, I. and Dudits, D.** A short histone H3 promoter from alfalfa specifies expression in S-phase cells and meristems. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **29P**, 27-32 (1993)
- Kawata, T., Nakayama, T., Mikami, K., Tabata, T., Takase, H. and Iwabuchi, M.** DNA binding protein(s) interacts with conserved nonameric sequence in the upstream regions of wheat histone genes. *FEBS Lett.* **239**, 319-323 (1988)
- Kedes, L.H.** Histone genes and histone messengers. *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 837-870 (1979)
- Kodama, H., Ito, M., Ohnishi, N., Suzuka, I. and Komamine, A.** Molecular cloning of the gene for plant proliferating-cell nuclear antigen and expression of this gene during the cell cycle in synchronized cultures of *Catharanthus roseus* cells. *Eur. J. Biochem.* **197**, 495-503 (1991)
- Kosugi, S., Suzuka, I., Ohashi, Y., Murakami, T. and Arai, Y.** Upstream sequences of rice proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene mediate expression of PCNA-GUS chimeric gene in meristems of transgenic tobacco plants. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1571-1576 (1991)
- Kunkel, T.A.** Rapid and efficient site-specific mutagenesis with-out phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **82**, 488-492 (1985)
- Kyozuka, J., Hayashi, Y. and Shimamoto, K.** High frequency plant regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods. *Mol. Gen. Genet.* **206**, 408-413 (1987)
- Kyozuka, J., Izawa, T., Nakajima, M. and Shimamoto, K.** Effect of the promoter and the first intron of maize Adh1 on foreign gene expression in rice. *Maydica* **35**, 353-357 (1990)
- LaBella, F., Gallinari, P., McKinney, J. and Heints, N.** Histone H1 subtype-specific consensus elements mediate cell cycle-regulated transcription *in vitro*. *Genes Dev.* **3**, 1982-1990 (1989)

- LaBella, F., Slive, H.L., Roeder, R.G. and Heintz, N.** Cell-cycle regulation of a human histone H2b gene is mediated by the H2b subtype-specific consensus element. *Genes Develop.* **2**, 32-39 (1988)
- Lepetit, M., Ehling, M., Atanassova, R., Chubet, N. and Gigot, C.** Replication-independent *cis*-acting element of a maize histone gene promoter. *Plant Science* **89**, 177-184 (1993)
- Lepetit, M., Ehling, M., Chaubet, N. and Gigot, C.** A plant histone gene promoter can direct both replication-dependent and -independent gene expression in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* **231**, 276-285 (1992)
- Levine, B.J., Chodchoy, N., Marzluff, W.F. and Skoultchi, A.I.** Coupling of replication type histone mRNA levels to DNA synthesis requires the stem-loop structure at the 3' end of the mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **84**, 6189-6193 (1987)
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor.: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982)
- Marzluff, W.F. and Pandey, N.B.** Multiple regulatory steps control histone mRNA concentrations. *Trends Biochem. Sci.* **13**, 49-52 (1988)
- Maxon, R., Cohn, R. and Kedes, L.** Expression and organization of histone genes. *Annu. Rev. Genet.* **17**, 239-277 (1983)
- Mettler, I.J.** A simple and rapid method for miniprep of DNA from tissue cultured plant cells. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 346-349 (1987)
- Mikami, K. and Iwabuchi, M.** Regulation of cell cycle-dependent gene expression. In *Control of Plant Gene Expression* (Verma, D.P.S., ed.). Boca Raton: CRC press, pp. 51-68 (1993)
- Mikami, K., Tabata, T., Kawata, T., Nakayama, T. and Iwabuchi, M.** Nuclear protein(s) binding to the conserved DNA hexameric sequence postulated to regulate transcription of wheat histone genes. *FEBS Lett.* **223**, 273-278 (1987)
- Mikami, K., Takase, H., Tabata, T. and Iwabuchi, M.** Multiplicity of the DNA-binding protein HBP-1 specific to the conserved hexameric sequence ACGTCA in various plant gene promoters. *FEBS Lett.* **256**, 67-70 (1989)

- Minami, M., Huh, G.H., Yang, P. and Iwabuchi, M.** Coordinate gene expression of five subclass histones and the putative transcription factors, HBP-1a and HBP-1b, of histone genes in wheat. *Plant Mol. Biol.* **23**, 429-434 (1993)
- Morris, T.D., Weber, L.A., Hickey, E., Stein, G.S. and Stein, J.L.** Changes in the stability of a human histone mRNA during the HeLa cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 544-553 (1991)
- Nagata, T., Okada, K. and Takebe, I.** Mitotic protoplasts and their infection with tobacco mosaic virus RNA encapsulated in liposomes. *Plant Cell Rep.* **1**, 250-252 (1982)
- Nakayama, T. and Iwabuchi, M.** Regulation of wheat histone H3 gene expression. *Critical Rev. in Plant Sci.* **12**, 97-110 (1993)
- Nakayama, T., Ohtsubo, N., Mikami, K., Kawata, T., Tabata, T., Kanazawa, H. and Iwabuchi, M.** *Cis*-acting sequences that modulate transcription of wheat histone H3 gene and 3' processing of H3 premature mRNA. *Plant Cell Physiol.* **30**, 825-832 (1989)
- Nakayama, T., Sakamoto, A., Yang, P., Minami, M., Fujimoto, Y., Ito, T. and Iwabuchi, M.** Highly conserved hexamer, octamer and nonamer motifs are positive *cis*-regulatory elements of the wheat histone H3 gene. *FEBS Lett.* **300**, 167-170 (1992)
- Ohtsubo, N. and Iwabuchi, M.** The conserved 3'-flanking sequence, AATGGAAATG, of the wheat histone H3 gene is necessary for the accurate 3'-end formation of mRNA. submitted
- Old, R.W. and Woodland, H.R.** Histone genes: Not so simple after all. *Cell* **38**, 624-626 (1984)
- Osley, M.A.** The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 827-861 (1991)
- Osley, M.A., Gould, J., Kim, S., Kane, M. and Hereford, L.** Identification of sequences in a yeast histone promoter involved in periodic transcription. *Cell* **45**, 537-544 (1986)

- Pandey, N.B. and Marzluff, W.F.** The stem-loop structure at the 3' end of histone mRNA is necessary and sufficient for regulation of histone mRNA stability. *Mol Cell Biol.* **7**, 4557-4559 (1987)
- Pedrali-Noy, G., Spadari, S. and Miller-Faures, A.** Synchronization of HeLa cell cultures by inhibition of DNA polymerase alpha with aphidicolin. *Nucl. Acids Res.* **8**, 377-387 (1980)
- Phillips, G., Chaubet, N., Chaboute, M.-E., Ehling, M. and Gigot, C.** Genomic organization and nucleotide sequences of two corn histone H4 genes. *Gene* **42**, 225-229 (1986)
- Raghavan, V.** mRNAs and a cloned histone gene are differentially expressed during anther and pollen development in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Cell Sci.* **92**, 217-229 (1989)
- Raghavan, V. and Olmedilla, A.** Spatial patterns of histone mRNA expression during grain development and germination in rice. *Cell Differ. Dev.* **27**, 183-196 (1989)
- Robbins, E. and Borun, T.W.** The cytoplasmic synthesis of histones in HeLa cells and its temporal relationship to DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **57**, 409-418 (1967)
- Sakamoto, A., Minami, M., Huh, G.-H. and Iwabuchi, M.** The putative zinc-finger protein WZF1 interacts with a *cis*-acting element of wheat histone genes. *Eur. J. Biochem.* **217**, 1049-1056 (1993)
- Sala, F., Magnien, E., Galli, M.G., Dalschaert, X., Pedrali-Noy, G. and Spadari, S.** DNA repair synthesis in plant protoplasts is aphidicolin-resistant. *FEBS Lett.* **138**, 213-217 (1982)
- Sassone-Corsi, P. and Borrelli, E.** Transcriptional regulation by *trans*-acting factors. *Trends Genet.* **2**, 215-219 (1986)
- Schümperli, D.** Cell-cycle regulation of histone gene expression. *Cell* **45**, 471-472 (1986)
- Schümperli, D.** Multilevel regulation of replication-dependent histone genes. *Trends. Genet.* **4**, 187-191 (1988)

- Shimamoto, K.** Transgenic Rice Plants. In *Plant Gene Research-Molecular Approaches to Crop Improvement* (Dennis, E.S. and Llewellyn, D.J., ed.). Wine: Spriger-Verlag, pp. 1-15 (1991)
- Shimamoto, K., Terada, R., Izawa, T. and Fujimoto, H.** Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* **338**, 274-276 (1989)
- Sittman, D.B., Graves, R.A. and Marzluff, W.F.** Histone mRNA concentrations are regulated at the level of transcription and mRNA degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **80**, 1849-1853 (1983)
- Smith, M.M.** DNA sequences of yeast H3 and H4 histone genes from two non-allelic gene sets encode identical H3 and H4 proteins. *J. Mol. Biol.* **169**, 663-690 (1983)
- Stein, G.S., Stein, J.L., van Wijnen, A.J. and Lian, J.B.** Regulation of histone gene expression. *Cur. Opinion Cell Biol.* **4**, 166-173 (1992)
- Stephenson, E.C., Ebra, H.P. and Gall, J.G.** Histone gene clusters of the newt *Notophthalmus viridescence* are separated by long tracts of satellite DNA. *Cell* **24**, 639-648 (1981)
- Sun, J., Pilch, D.R. and Marzluff, W.F.** The histone mRNA 3' end is required for localization of histone mRNA to polyribosomes. *Nucleic Acids Res.* **20**, 6057-6066 (1992)
- Tabata, T., Fukazawa, M. and Iwabuchi, M.** Nucleotide sequence and genomic organization of a wheat histone H3 gene. *Mol. Gen. Genet.* **196**, 397-400 (1984)
- Tabata, T. and Iwabuchi, M.** Molecular cloning and nucleotide sequence of a variant wheat histone H4 gene. *Gene* **31**, 285-289 (1984)
- Tabata, T. and Iwabuchi, M.** Characteristic sequences in the 3' flanking region of wheat histone genes. *Plant Cell Physiol.* **27**, 929-933 (1986)
- Tabata, T., Nakayama, T., Mikami, K. and Iwabuchi, M.** HBP-1a and HBP-1b: leucine zipper-type transcription factors of wheat. *EMBO J.* **10**, 1459-1467 (1991)
- Tabata, T., Sasaki, K. and Iwabuchi, M.** The structural organization and DNA sequences of a wheat histone H4 gene. *Nucl. Acids Res.* **11**, 5865-5875 (1983)

- Tabata, T., Takase, H., Takayama, S., Mikami, K., Nakatsuka, A., Kawata, T., Nakayama, T. and Iwabuchi, M.** A protein that binds to a *cis*-acting element of wheat histone genes has a leucine zipper motif. *Science* **245**, 965-967 (1989)
- Takase, H. and Iwabuchi, M.** Transcriptional and post-transcriptional regulation of the expression of wheat histone genes; *cis*-acting elements and trans-acting factors. *J. Plant Res.* **3**, 37-50 (1993)
- Takase, H., Minami, M. and Iwabuchi, M.** Sequence-specific single-strand DNA-binding proteins that interact with the regulatory regions of wheat histone H3 and H4 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**, 1593-1600 (1991a)
- Takase, H., Tabata, T., Mikami, K. and Iwabuchi, M.** Partial purification and characterization of two transcription factors, HBP-1a and HBP-1b, specific for a *cis*-acting element, ACGTCA, of wheat histone genes. *Plant Cell Physiol.* **32**, 1195-1203 (1991b)
- Terada, R., Nakayama, T., Iwabuchi, M. and Shimamoto, K.** A type I element composed of the hexamer (ACGTCA) and octamer (CGCGGATC) motifs plays a role(s) in meristematic expression of a wheat histone H3 gene in transgenic rice plants. *Plant J.* submitted
- Terada, R., Nakayama, T., Iwabuchi, M. and Shimamoto, K.** A wheat histone H3 promoter confers cell division-dependent and -independent expression of the *gus* A gene in transgenic rice plants. *Plant J.* **3**, 241-252 (1993)
- Wu, R.S. and Bonner, W.M.** Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell* **27**, 321-330 (1981)
- Wu, S.C., Bögre, L., Vincze, É., Kiss, G.B. and Dudits, D.** Isolation of an alfalfa histone H3 gene: structure and expression. *Plant Mol. Biol.* **11**, 641-649 (1988)
- Wu, S.C., Györgyey, J. and Dudits, D.** Polyadenylated H3 histone transcripts and H3 histone variants in alfalfa. *Nucleic Acids Res.* **17**, 3057-3063 (1989a)
- Wu, S.C., Végh, Z., Wang, X.-M., Tan, C.C. and Dudits, D.** The nucleotide sequences of two rice histone H3 genes. *Nucleic Acids Res.* **17**, 3297 (1989b)

Yang, P., Katsura, M., Nakayanma, T., Mikami, K. and Iwabuchi, M. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNAs for histone H1 and H2B variants from wheat. *Nucl. Acids Res.* **19**, 5077 (1991)

表 1. 形質転換イネ培養細胞の β -グルクロニダーゼ (GUS) 活性の比較

Transformed cell line	GUS activity ^{a, b} (pmol 4MU/min/mg protein)		
	-1711H3/GUS	-908H3/GUS	-185H3/GUS
1711-1	101		
-2	106		
-3	535		
-4	638		
-5	688		
-6	755		
-7	1433		
-8	3583		
-9 ^c	5967		
-10	7026		
-11	7905		
-12 ^c	10 352		
-13	13 631		
908-14		71	
-15		140	
-16		250	
-17		400	
-18		1883	
-19		2783	
-20 ^c		3200	
-21 ^c		7817	
185-22			48
-23			60
-24			70
-25			82
-26			103
-27			115
-28			131
-29			133
-30			202
-31			255
-32			383
-33 ^c			447
-34 ^c			945
-35 ^c			1118
Average	4054	2068	292

^a GUS の酵素活性の測定には寒天培地上で培養した 200 mg のカルスを用いた。測定は Jefferson ら (1987) の方法に従った。

^b H3/GUS 遺伝子を持たない細胞の GUS 活性は 10 以下である。

^c これらの細胞を以下の機能解析の実験に用いた。

表 2. 形質転換培養細胞における同調解除後の GUS 活性の変化

Time after release (h)	GUS activity ^{a, b} (pmol 4MU/min/mg protein)				
	1711-9		1711-12	908-21	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 1	Exp. 2
0	5133	7267	18 583	20 700	16 300
1	4983	7767	21 233	18 833	19 150
2	5217	7883	25 433	23 483	23 433
3	6717	9467	27 183	20 267	28 416
4	6217	9250	30 150	23 033	25 716
5	6983	9533	29 683	19 567	27 467
6	6833	9583	25 300	24 267	26 333
7	6067	10 267	27 500	22 033	26 267

^a 液体培養細胞 200 mg を測定に用いた

^b H3/GUS 遺伝子を持たない細胞の GUS 活性は 10 以下である。

表 3. 植物ヒストン遺伝子のプロモーター領域に見られるタイプ I エLEMENT

Gene	Plant	Clone	Sequence	Reference
H2B	Wheat	TH153	CC <u>ACGTCA</u> gC <u>GATCCGCG</u>	Yang and Iwabuchi (unpublished)
H3	Wheat	TH012	CC <u>ACGTCA</u> CC <u>aATCCGCG</u>	Tabata <i>et al.</i> (1984)
	Alfalfa	ALH3-1.1	CC <u>ACGTCA</u> 1C <u>GATCCGCG</u>	Wu <i>et al.</i> (1988)
	Parsley	PcH3-7	CC <u>ACGTCA</u> CC <u>GATCCGCG</u>	Wu <i>et al.</i> (unpublished)
		PcH3-16	CC <u>ACGTCA</u> CC <u>GATCCGCG</u>	Wu and Harlbrock (unpublished)
		PcH3-20	CC <u>ACGTCA</u> 1C <u>GATCCGCG</u>	Wu <i>et al.</i> (unpublished)
H4	Wheat	TH011	CC <u>ACGTCA</u> CC <u>GATCCGCG</u>	Tabata <i>et al.</i> (1983)
		TH081	CC <u>ACGTCA</u> CC <u>GATCCGCG</u>	Fujimoto and Iwabuchi (unpublished)
	Corn	C7	CC <u>ACGTCA</u> gC <u>GATCCGCG</u>	Philipps <i>et al.</i> (1986)
		C13	CC <u>ACGTCA</u> gC <u>GATCCGCG</u>	Gigot <i>et al.</i> (1987)
Consensus sequence			CC <u>ACGTCA</u> NC <u>GATCCGCG</u>	

ヘキサマー配列及びオクタマー配列（一般に提唱されているものとは逆向き）は下線で示した

表 4. プロモーター領域の変異が細胞周期特異的な遺伝子発現に与える影響のまとめ

プロモーター領域	細胞周期特異的発現	
	上流域を持つ場合 (-1716H3/GUS)	上流域を持たない場合 (-184H3/GUS)
wt (wild)	+++ ^a	+++
mod	+++	+++
ΔHS	+	n. t.
ΔHN	+++	n. t.
Hex.M	+	—
Oct.M	+++	—
Hex.M-Oct.M	n. t.	—

^a -1711H3/GUS (IBコンストラクト) を用いた場合の結果
n. t. : not tested

H3 promoter region

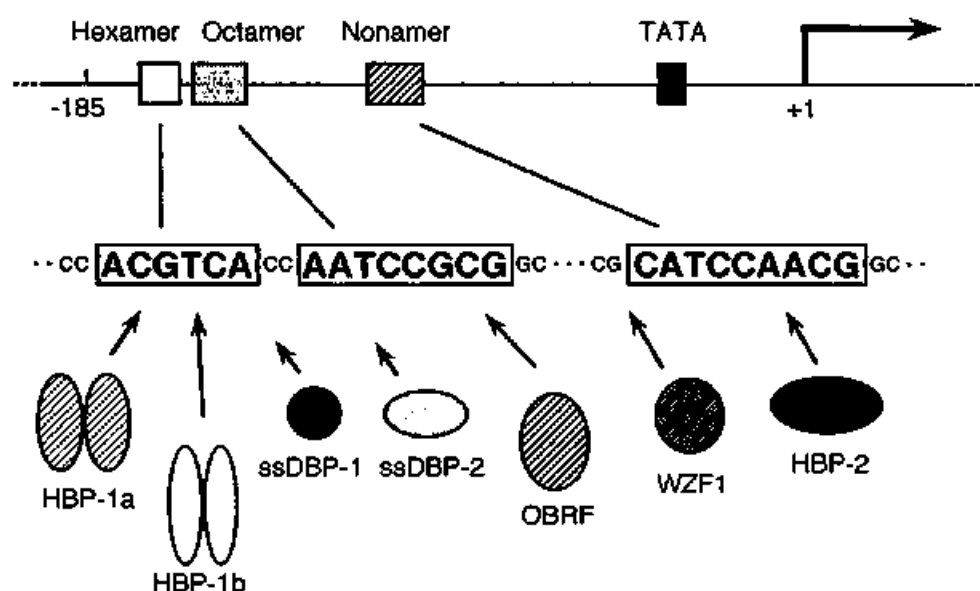


図1 コムギ・ヒストン H3 遺伝子 (TH012) プロモーター領域に存在するシス配列とこれらに結合する蛋白因子

H3 プロモーター -185 から +1 付近の構造の模式図。TATA は TATA-box、+1 は転写開始点、矢印は転写の方向を示す。ヘキサマー、オクタマー、ノナマーのそれぞれの塩基配列は図中央に示した。コムギ核抽出物を用いたゲルシフト法などから、これら配列及びその付近に特異的に結合する蛋白因子が同定されている。HBP-1a 及び HBP-1b はホモダイマー（あるいはサブファミリー間のヘテロダイマー）を形成してヘキサマー配列に結合する。

A

AccI primer	5'-CTCGACCGTC <u>ACT</u> CCATCCG-3'
XbaI primer	5'-CATGCCTCT <u>G</u> CCCCTCCCGA-3'
NotI primer	5'-ACCCAAAC <u>CG</u> CCGCTCTC-3'
BamHI primer	5'-CCTCCGGCG <u>ATC</u> CGAATTGG-3'

B

HKS* Adaptor	5'-AAGCTTGGTACCAGCT-3'
	3'-TTCGAACCATGG-5'

C

<i>Hind</i> III- <i>Sac</i> II fragment	5'-AGCTTTCGGCCACGTCACCAATCCGC-3' 3'-AAGCCGGTGCAGTGGTTAGG-5'
Hex.M	5'-AGCTTTCGGCCA <u>GT</u> ACCAATCCGC-3' 3'-AAGCCGGT <u>CA</u> TGGTTAGG-5'
Oct.M	5'-AGCTTTCGGCCACGTCACC <u>GC</u> -3' 3'-AAGCCGGTGCAGTGG <u>GC</u> -5'
Hex.M-Oct.M	5'-AGCTTTCGGCCA <u>GT</u> ACC <u>GC</u> -3' 3'-AAGCCGGT <u>CA</u> TGG <u>GC</u> -5'

図 2. H3/GUS キメラ遺伝子及びその変異遺伝子の作製に用いた合成 DNA の配列

2 本鎖のものに関しては、それぞれの鎖を合成し、アニーリングさせて用いた。

A : site-directed mutagenesis 法に用いた合成プライマー。これら 4 つのプライマーをテンプレートに同時にハイブリダイズさせ、4 つ（プロモーター領域に 3 つ、H3 と GUS の結合部位に相当する領域に 1 つ）の制限酵素サイトを作製した。置換した塩基をトーンで、制限酵素サイトに相当する部分を下線で示した。

B : pNHGN1716 (-1716H3/GUS 遺伝子) の作製に用いた合成アダプターの配列。 *Hind*III サイトと *Kpn*I サイトを持つ。

C : H3 遺伝子の *Hind*III/*Sac*II 断片に相当する合成 DNA。この DNA 断片で当該領域を置き換えることにより、ヘキサマー配列あるいはオクタマー配列に変異を導入した。

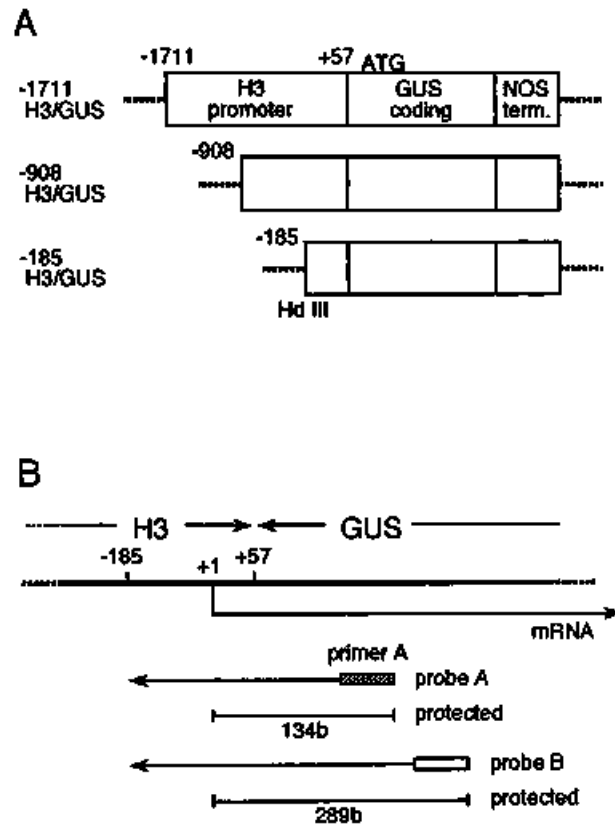


図 3. H3/GUS キメラ遺伝子の構造と S1 法での解析に用いたプローブ

A：イネ培養細胞の形質転換に用いた -1711H3/GUS 遺伝子及びその 5' 欠失変異遺伝子の模式図。数字は H3 遺伝子の転写開始点 (+1) からの距離を示す。点線は pUC119 ベクターの配列。ATG；GUS の翻訳開始コドン。HdIII；*Hind*III の制限酵素サイト。

B：S1 法での解析に用いた一本鎖 DNA プローブ。H3 プロモーターと GUS コード領域の結合部位付近の構造、転写産物、プローブ、及び検出される DNA 断片を模式的に示した。数字は H3 遺伝子の転写開始点 (+1) からの距離を示す。プライマー A を用いて合成されるプローブ A (-180 から +134 まで) は、転写開始点決定 (図 5) にのみ用いた。プローブ B (-180 から +289 まで) は他のすべての S1 法による実験に用いた。

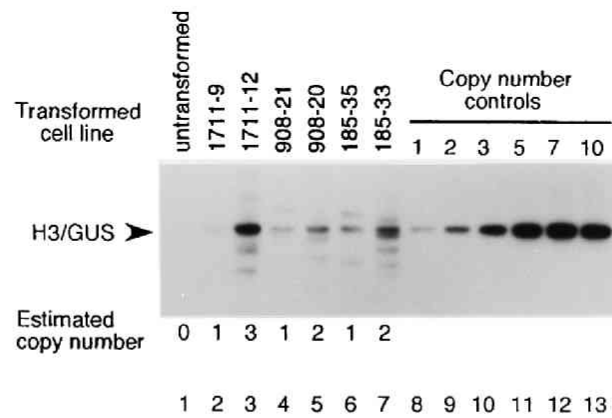


図 4. 形質転換イネ培養細胞ゲノム DNA の Southern 法による解析

遺伝子導入を行っていない Oc 細胞（レーン 1）及び形質転換細胞（レーン 2-7）から得たゲノム DNA を *Hind*III/*Eco*RI で切断し、泳動した。レーン 8-13 はコピー数のコントロールで、p185H3/GUS を *Hind*III/*Eco*RI で切断したものをイネゲノムの 2n あたり 1-10 コピーに相当する量泳動した。H3/GUS 遺伝子の存在を示す 2.4 kb の断片に相当するバンドは矢印で示した。導入された H3/GUS 遺伝子のコピー数はオートラジオグラムの下に示した。

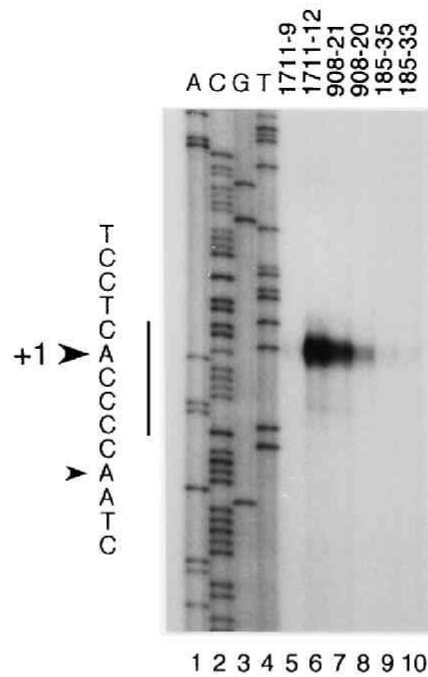


図 5. 形質転換培養細胞から抽出した全 RNA の S1 法による解析

ダイデオキシ法によるシーケンス反応（レーン 1-4）と転写開始点決定のための S1 法（レーン 5-10）に用いたプローブの合成には図 3 のプライマー A を用いた。それぞれ反応後、8% ポリアクリルアミドゲルで展開した。H3 遺伝子の転写開始点に相当する A 残基は +1（大きな矢印）で、わずかに転写のおこる +6 の A 残基は小さな矢印で示した。

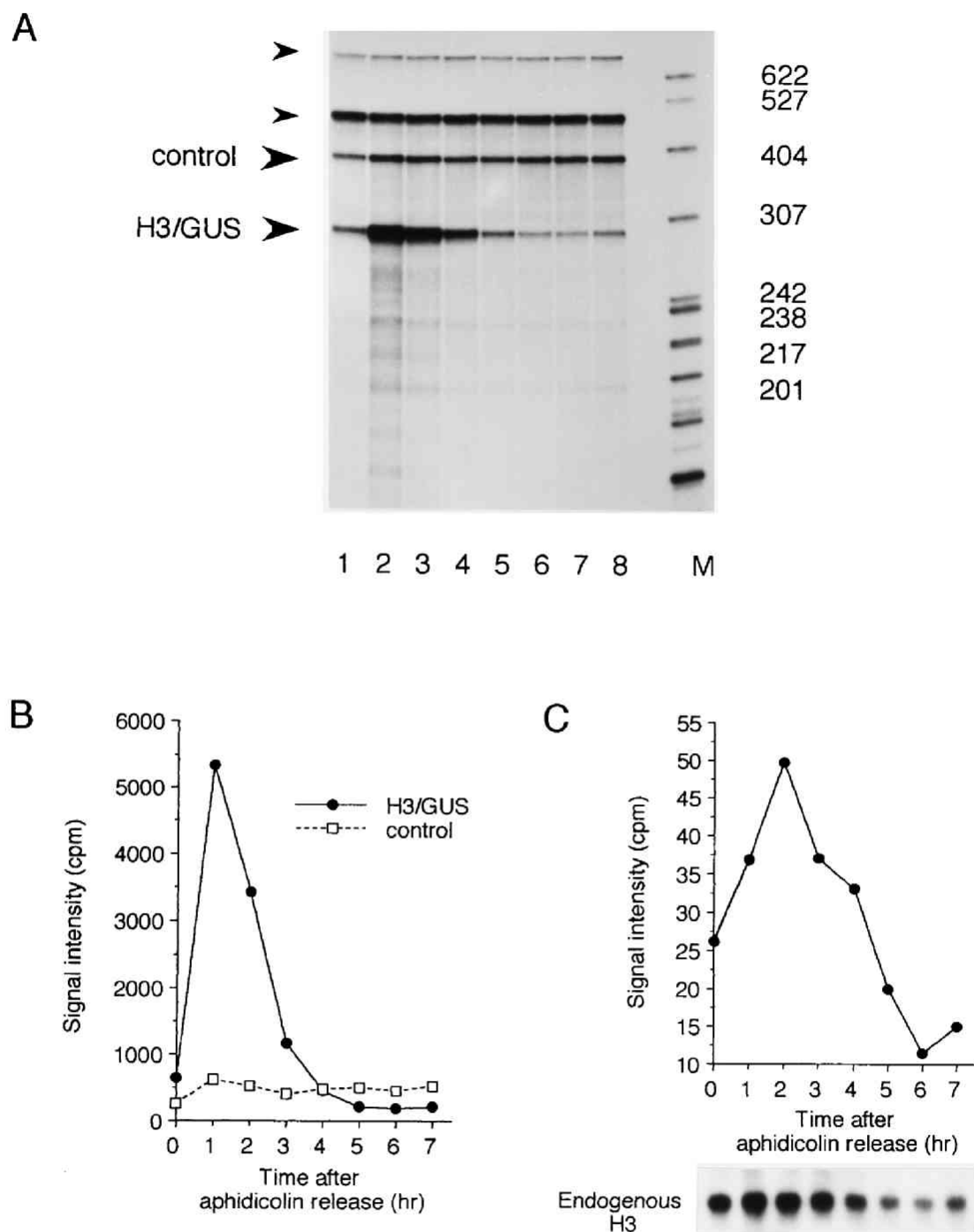


図 6. イネ培養細胞同調系を用いた H3/GUS キメラ遺伝子及び内在 H3 遺伝子の発現パターンの解析 (図の説明は次頁参照)

図 6. イネ培養細胞同調系を用いた H3/GUS キメラ遺伝子及び内在 H3 遺伝子の発現パターンの解析

アフディコリン除去後 0-7 時間の細胞 (1711-12 細胞株) よりそれぞれ全 RNA を抽出し、それぞれの解析に用いた。

A: S1 法による H3/GUS 及び Hm^r (コントロール) mRNA の解析。均一にラベルしたプローブ B (図 3 参照) 及び Hm^r プローブを用いた。薬剤除去後 1 時間ごとの mRNA 量の変動を見ている (0-7 時間; レーン 1-8)。mRNA 量の指標となる S1 処理後のプローブ断片に相当するバンドは大きな矢印で示した。小さな矢印はプローブの全長に相当するバンドで、プローブを過剰量投入しているためにしばしば見られる (上; Hm^r プローブ、下; H3/GUS プローブ)。HpaII で切断した pBR322 DNA を末端ラベルしたものをサイズマーカーとして同時に泳動している (レーン M)。

B: パネル A の結果をグラフで表したもの。それぞれのシグナルに相当する放射活性は、乾燥したアクリルアミドゲルから AMBIS Radioanalytic Imaging System によって直接読み取り定量した。

C: Northern 法によるイネ内在 H3 遺伝子の発現の解析。パネル A の S1 法に用いたものと同じ RNA 10 µg を 1% アガロース (ホルムアルデヒド) ゲルで展開した。

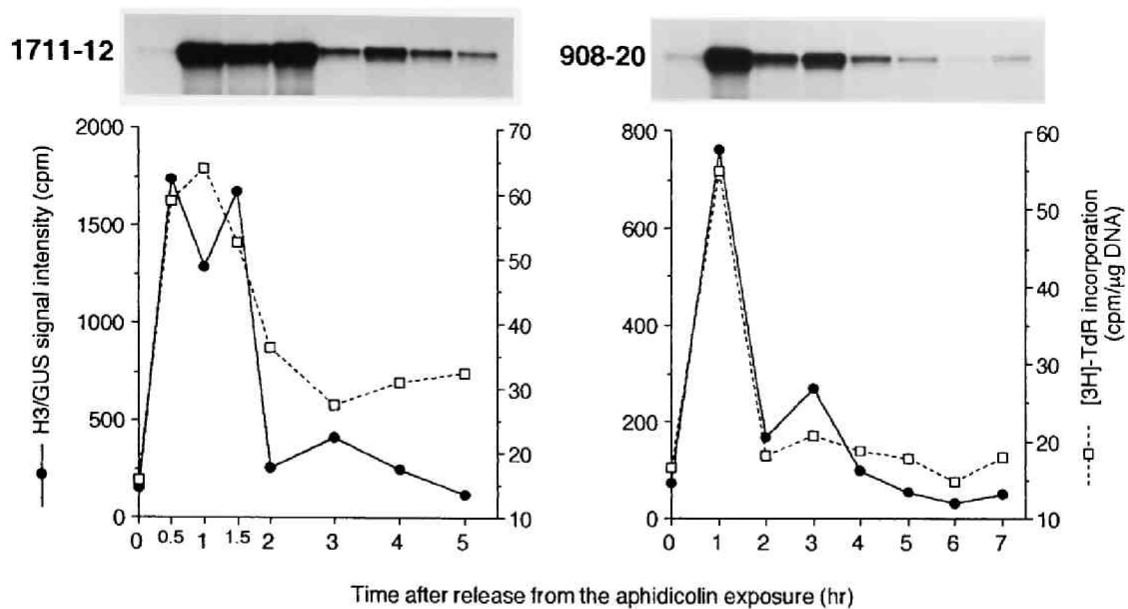


図7 イネ培養細胞における H3/GUS 遺伝子の発現と DNA 合成の共役

アフィディコリン除去後の mRNA 量の変動 (●) は S1 法で、DNA 合成量の変動 (□) は $[^3\text{H}]$ チミジンを用いたパルスラベル法で解析した。細胞株 1711-12 と 908-20 を用いた。1711-12 を用いた解析では、薬剤除去後 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 時間でサンプリングした。同様に 908-20 を用いた解析では 0-7 時間で 1 時間ごとにサンプリングしている。手順の詳細については本文参照。

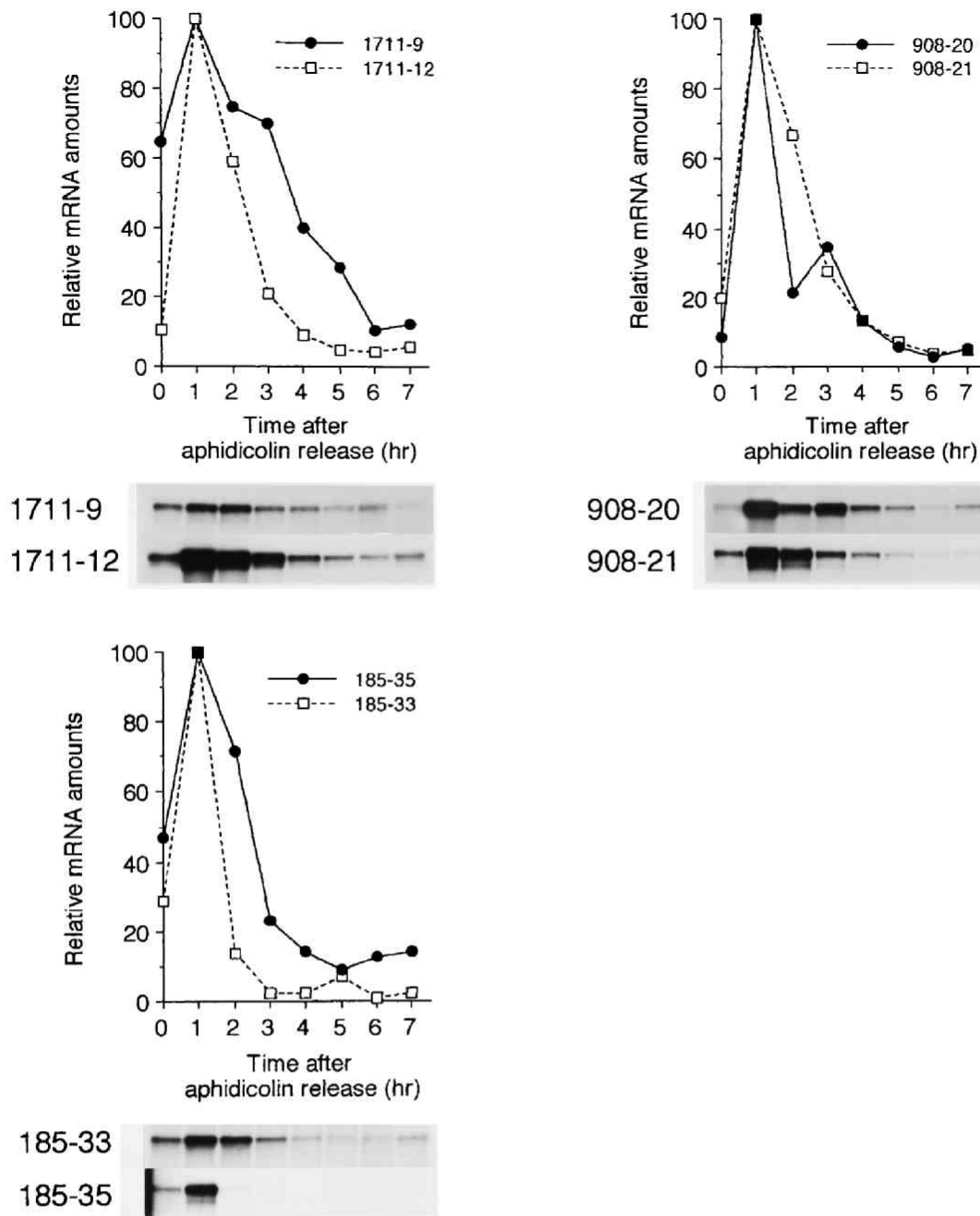


図 8. S1 法による -1711 H3/GUS 遺伝子及びその 5' 欠失変異遺伝子の薬剤除去後の発現パターンの解析

アフィディコリン除去後の mRNA 量の変動を S1 法により解析した。サンプリングは薬剤除去後 0-7 時間で 1 時間ごとに行った。それぞれの遺伝子について 2 種類 (●, □)、計 6 種類の細胞株 (1711-9, -12; 908-20, -21; 185-33, -35) を用いた。mRNA 量は最大値を 100 とし、プロットしてある。細胞周期の同調化、RNA の調製、S1 法による定量・解析の手順については本文参照。

-1716H3/GUS (pNHGN1716wt)

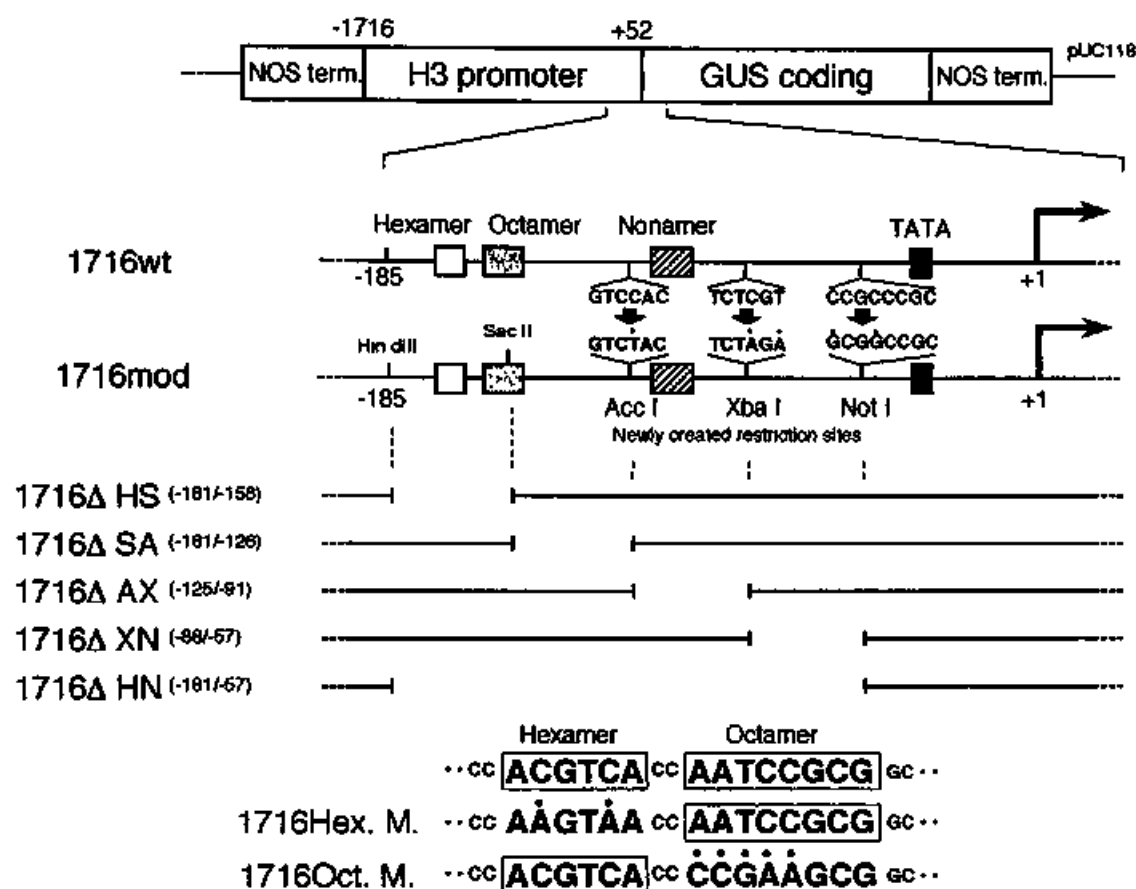
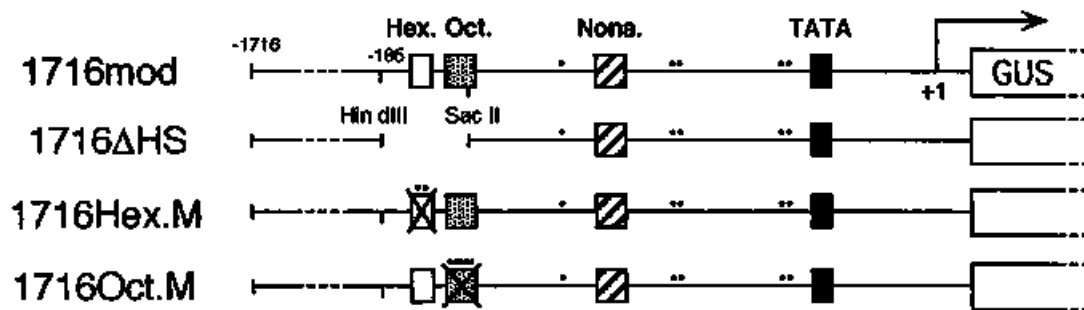


図 9. H3 プロモーターの機能解析に用いた -1716H3/GUS 遺伝子及びその変異遺伝子の構造

-1716H3/GUS 遺伝子 (pNHGN1716) の模式図及びこれをもとに構築した変異遺伝子のプロモーター領域の構造。図中の数字は転写開始点 (+1) からの距離を示す。NOS 遺伝子の転写終結配列を含む断片 (NOS term.) は H3/GUS 遺伝子上流、下流それぞれに導入した。3つのシス配列 (Hexamer, Octamer, Nonamer) 及び TATA ボックス (TATA) の位置を示した。+1 からの矢印は転写の方向を表す。1716mod では site-directed mutagenesis 法を用いて合計 5 bp の塩基置換を導入することにより、プロモーター領域に 3 つの新たな制限酵素サイト (AccI, XbaI, NotI) を作り出してある。(●) は塩基置換の導入された位置を示す。これらのサイトを用いて欠失、置換などの変異を導入した (詳細は本文参照)。1716Hex.M、1716Oct.M についてはヘキサマー配列及びオクタマー配列を含む領域の塩基配列を示した。1716ΔSA については形質転換細胞が得られなかった。

A



B

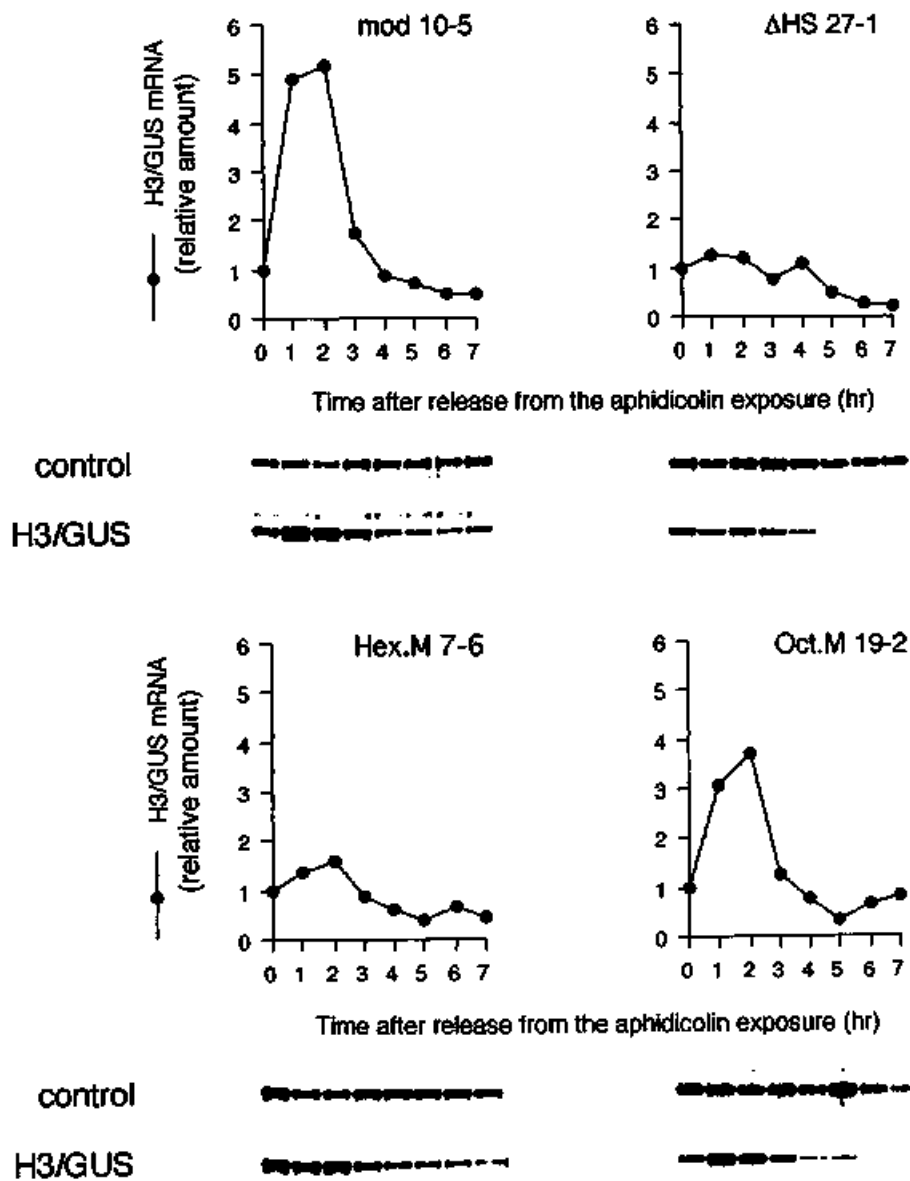


図 10. S1 法による -1716H3/GUS 遺伝子及びその変異遺伝子の薬剤除去後の発現パターンの解析 (1) (図の説明は次頁参照)

図 10. S1 法による -1716H3/GUS 遺伝子及びその変異遺伝子の薬剤除去後の発現パターンの解析 (1)

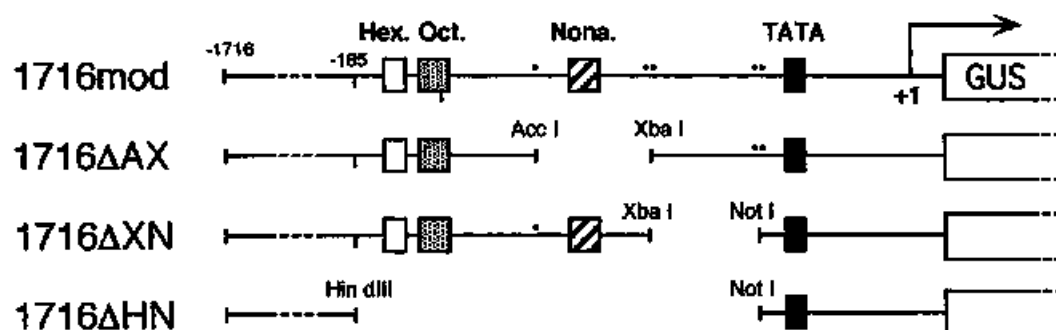
1716mod 及びヘキサマー配列周辺に変異を導入した3種類の H3/GUS キメラ遺伝子

(1716 Δ HS, 1716Hex.M, 1716Oct.M) について、アフィディコリン除去後の mRNA 量の変動を S1 法を用いて解析した。細胞株 mod 10-5、 Δ HS 27-1、Hex.M 7-6、Oct.M 19-2 をそれぞれ用いた。

A: 4 種類の H3/GUS 遺伝子 (1716mod, 1716 Δ HS, 1716Hex.M, 1716Oct.M) のプロモーター領域の模式図。Hex.、Oct.、Nona.、TATA はそれぞれヘキサマー配列、オクタマー配列、ノナマー配列と TATA ボックスを示す。数字は転写開始点 (+1) からの距離、矢印は転写の方向、(●) は塩基置換を導入した位置を表す。HindIII、SacI は欠失変異の導入に用いた制限酵素サイトを表す。

B: S1 法による解析。薬剤除去後 0-7 時間で 1 時間ごとにサンプリングし、H3/GUS mRNA 量及びコントロールの Hm' mRNA 量の変動を S1 法により解析した。グラフでは H3/GUS mRNA 量の変動を Hm' mRNA 量の変動で補正し、0 時間の値を 1 とした相対値でプロットしてある。細胞周期の同調化、RNA の調製、S1 法による定量・解析の手順については本文参照。

A



B

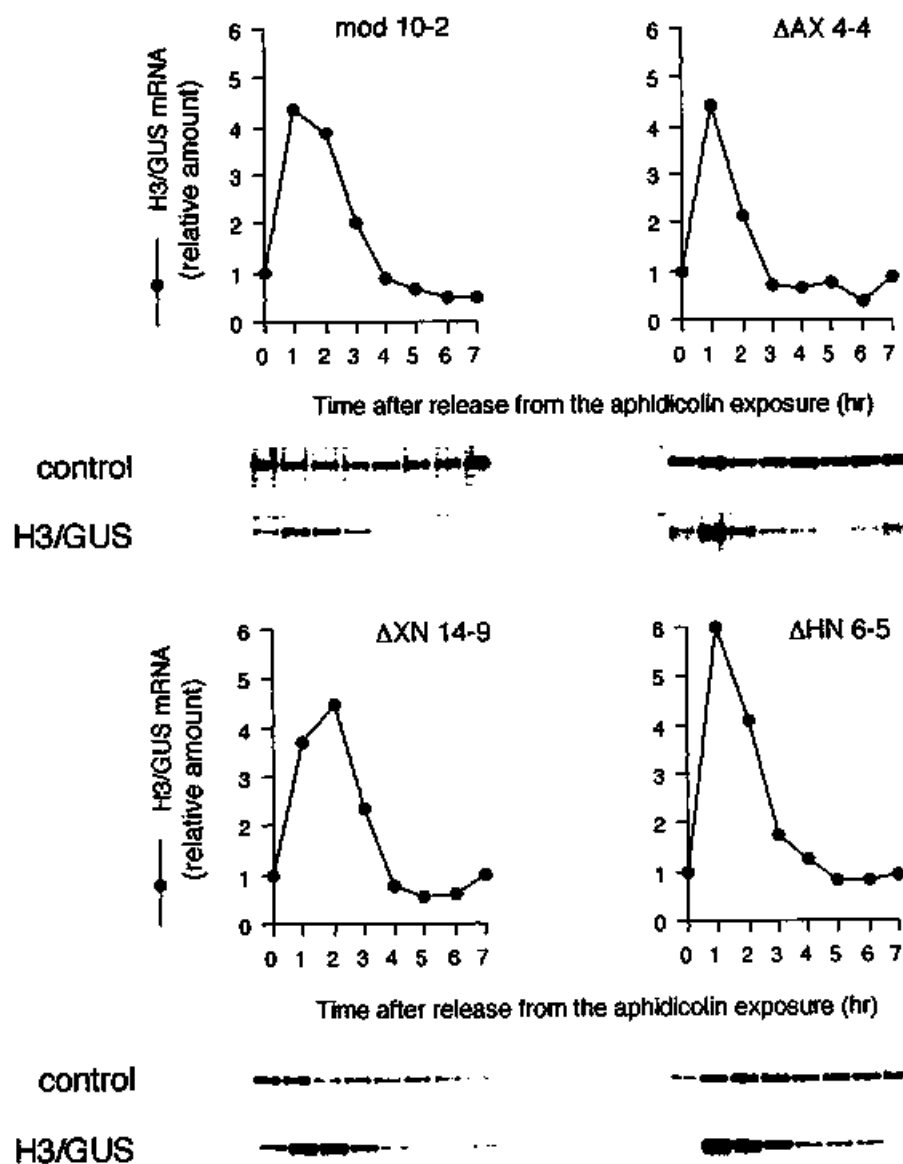


図 11 S1 法による -1716H3/GUS 遺伝子及びその変異遺伝子の薬剤除去後の発現パターン解析 (2) (図の説明は次頁参照)

図 11 S1 法による -1716H3/GUS 遺伝子及びその変異遺伝子の薬剤除去後の発現パターンの解析 (2)

1716mod 及び欠失変異を導入した 3 種類の H3/GUS キメラ遺伝子 (1716 Δ AX, 1716 Δ XN, 1716 Δ HN) について、アフィディコリン除去後の mRNA 量の変動を S1 法を用いて解析した。細胞株 mod 10-2、 Δ AX 4-4、 Δ XN 14-9、 Δ HN 6-5 をそれぞれ用いた。

A : 4 種類の H3/GUS キメラ遺伝子 (1716mod, 1716 Δ AX, 1716 Δ XN, 1716 Δ HN) のプロモーター領域の模式図。Hex.、Oct.、Nona.、TATA はそれぞれヘキサマー配列、オクタマー配列、ノナマー配列と TATA ボックスを示す。数字は転写開始点 (+1) からの距離、矢印は転写の方向、(●) は塩基置換を導入した位置を表す。HindIII、AccI、XbaI、NotI はいずれも欠失変異の導入に用いた制限酵素サイトを表す。

B : S1 法による解析。薬剤除去後 0-7 時間で 1 時間ごとにサンプリングし、H3/GUS mRNA 量及びコントロールの Hm' mRNA 量の変動を S1 法により解析した。グラフでは H3/GUS mRNA 量の変動を Hm' mRNA 量の変動で補正し、0 時間の値を 1 とした相対値でプロットしてある。細胞周期の同調化、RNA の調製、S1 法による定量・解析の手順については本文参照。

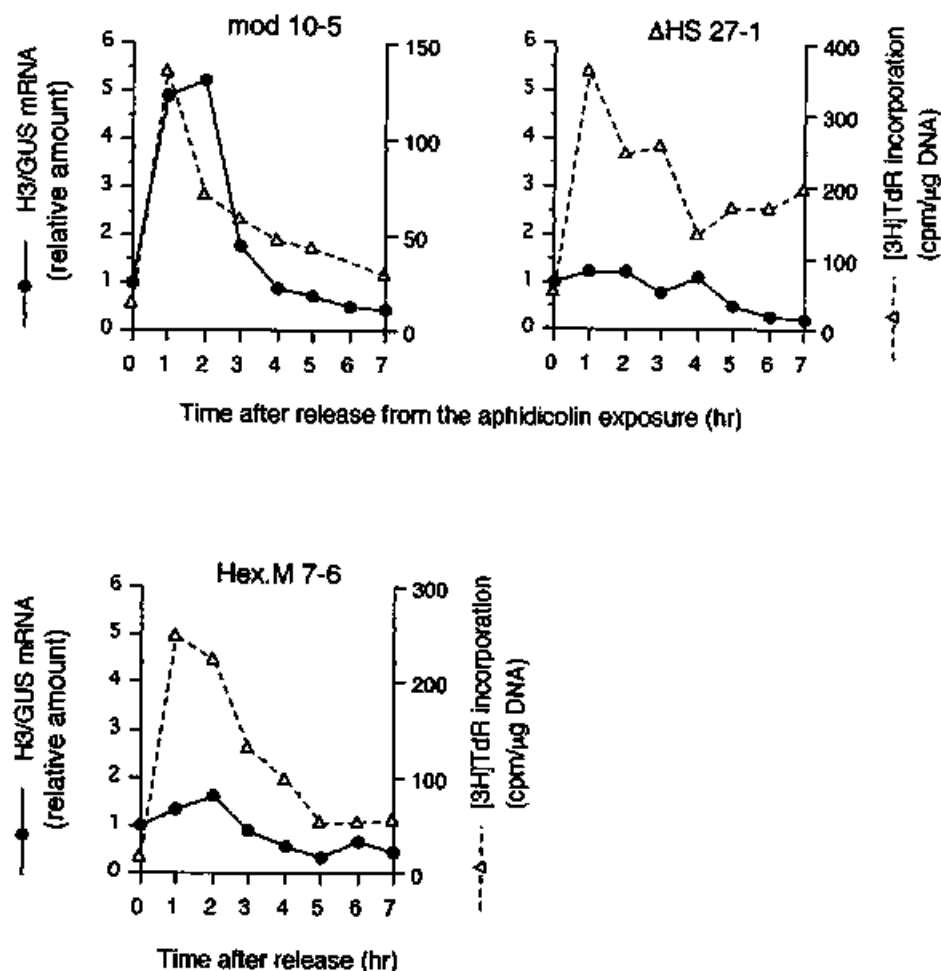


図 12. 薬剤除去後の H3/GUS キメラ遺伝子の発現と DNA 合成量の変動パターンの比較

図 10 の実験における薬剤除去後の mRNA 量の変動 (●) を、 $[^3\text{H}]$ チミジンをを用いたパルスラベル法で解析した DNA 合成量の変動 (△) と比較した。H3/GUS mRNA 量の変動はコントロールの Hm⁺mRNA 量の変動で補正し、0 時間の値を 1 とした相対値でプロットしてある (図 10 説明参照)。DNA 合成量は DNA 1 μg 、1 分間当たりのカウントを実測値でプロットした。パルスラベル法の詳細については本文参照。

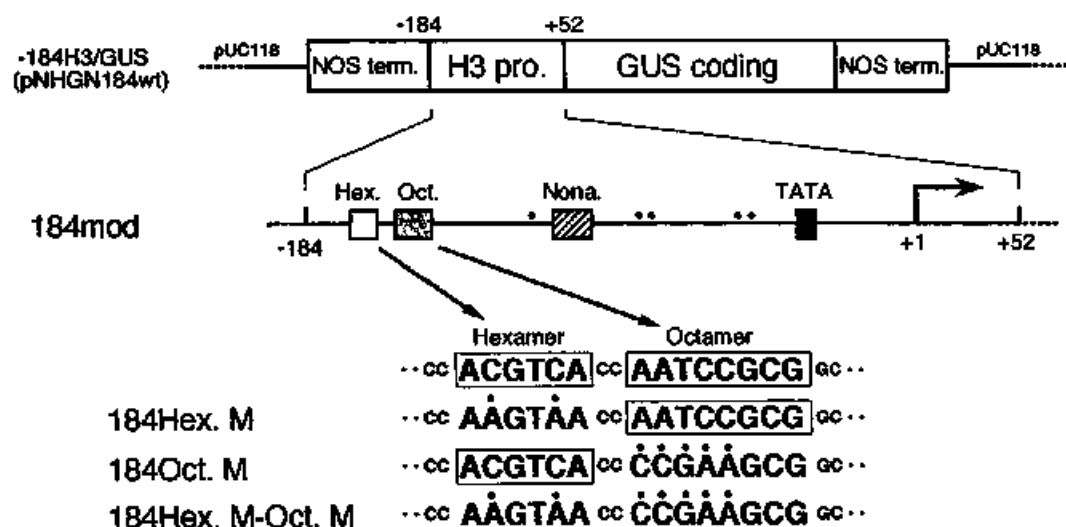
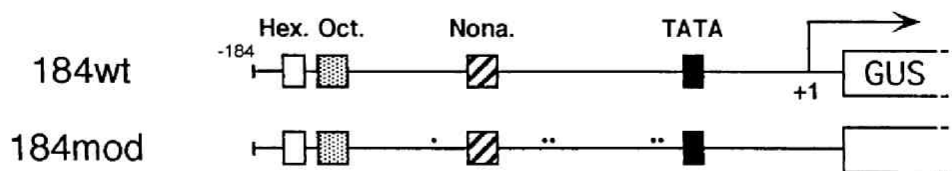


図 13. -184H3/GUS 遺伝子及びその変異遺伝子の構造

-184H3/GUS 遺伝子 (pNHGN184) の模式図及びこれをもとに構築した変異遺伝子のプロモーター領域の構造。図中の数字は転写開始点 (+1) からの距離を示す。NOS 遺伝子の転写終結配列を含む断片 (NOS term.) は H3/GUS キメラ遺伝子上流、下流それぞれに導入した。3 つのシス配列 (Hexamer, Octamer, Nonamer) 及び TATA ボックス (TATA) の位置を示した。+1 からの矢印は転写の方向を表す。変異を導入した位置及び配列は -1716H3/GUS 遺伝子と同様。184Hex.M-Oct.M ではヘキサマー配列及びオクタマー配列に同時に塩基置換を導入している。(●) は塩基置換の導入された位置を示す。ヘキサマー配列及びオクタマー配列を含む領域の塩基配列を示した。

A



B

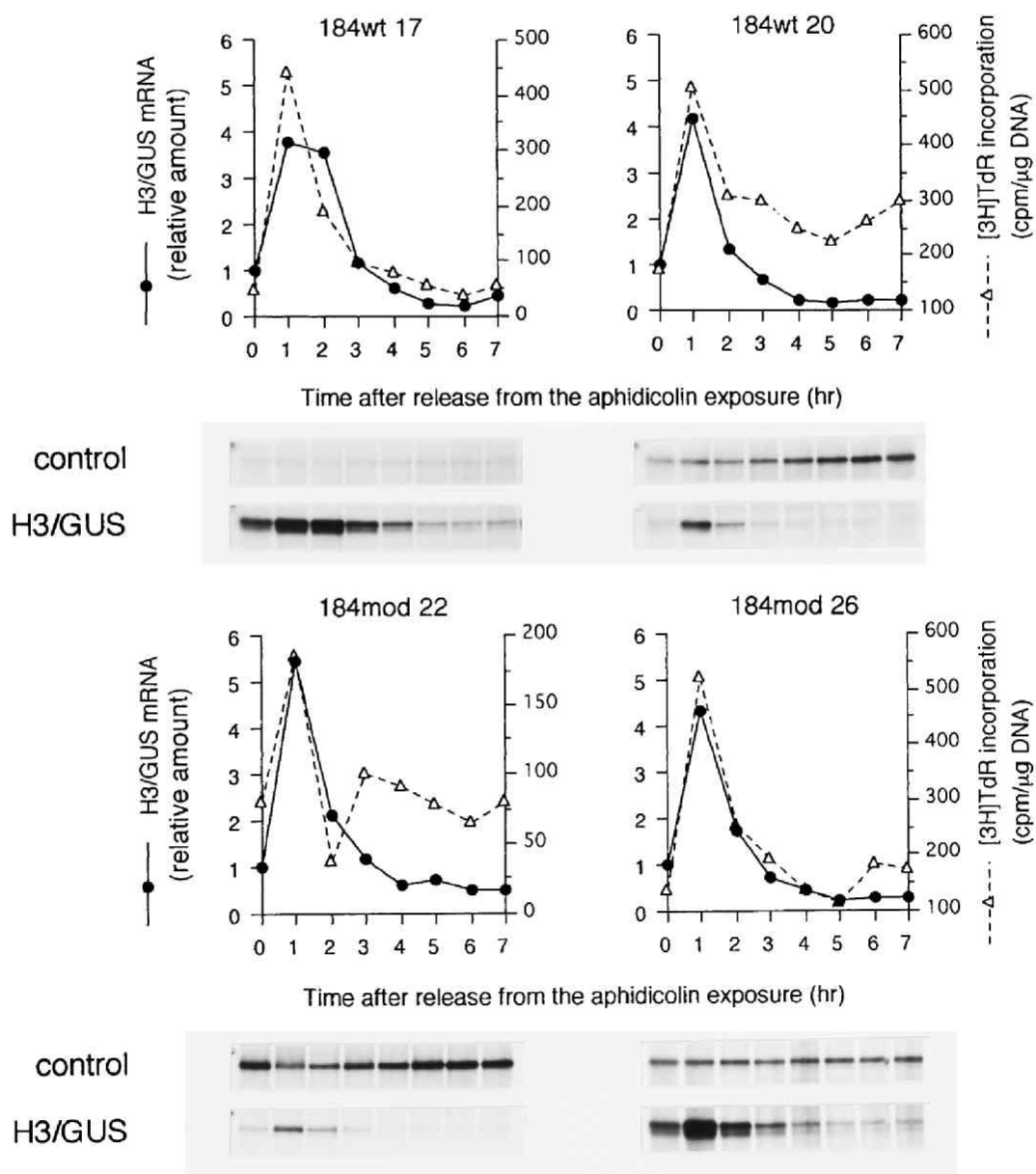


図 14. S1 法による -184H3/GUS 遺伝子及びその変異遺伝子の薬剤除去後の発現パターンの解析 (1) (図の説明は次頁参照)

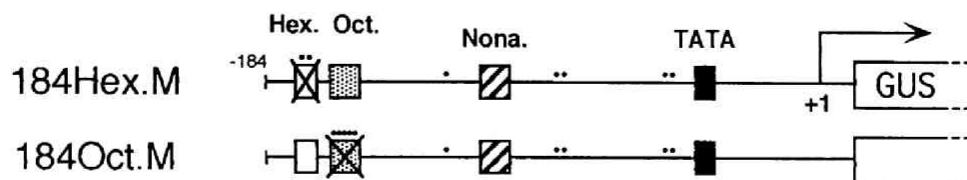
図 14. S1 法による -184H3/GUS 遺伝子及びその変異遺伝子の薬剤除去後の発現パターンの解析 (1)

184wt 及び 184mod の 2 種類の H3/GUS キメラ遺伝子について、アフィディコリン除去後の mRNA 量の変動を S1 法を用いて解析した。細胞株 184wt 17 及び 20、184mod 22 及び 26 をそれぞれ用いた。

A: 2 種類の H3/GUS キメラ遺伝子 (184wt, 184mod) のプロモーター領域の模式図。Hex.、Oct.、Nona.、TATA はそれぞれヘキサマー配列、オクタマー配列、ノナマー配列と TATA ボックスを示す。数字は転写開始点 (+1) からの距離、矢印は転写の方向、(●) は塩基置換を導入した位置を表す。

B: S1 法による解析。薬剤除去後 0-7 時間で 1 時間ごとにサンプリングし、H3/GUS mRNA 量及びコントロールの Hm' mRNA 量の変動を S1 法により解析した。H3/GUS mRNA 量の変動 (●) は Hm' mRNA 量の変動で補正後、0 時間の値を 1 とした相対値でプロットしてある。また、 $[^3\text{H}]$ チミジンを用いたパルスラベル法で解析した DNA 合成量の変動 (Δ) を同時に示した。DNA 合成量は DNA 1 μg 、1 分間当たりの放射活性を実測値でプロットした。細胞周期の同調化、RNA の調製、S1 法による定量・解析、パルスラベル法の詳細については本文参照。

A



B

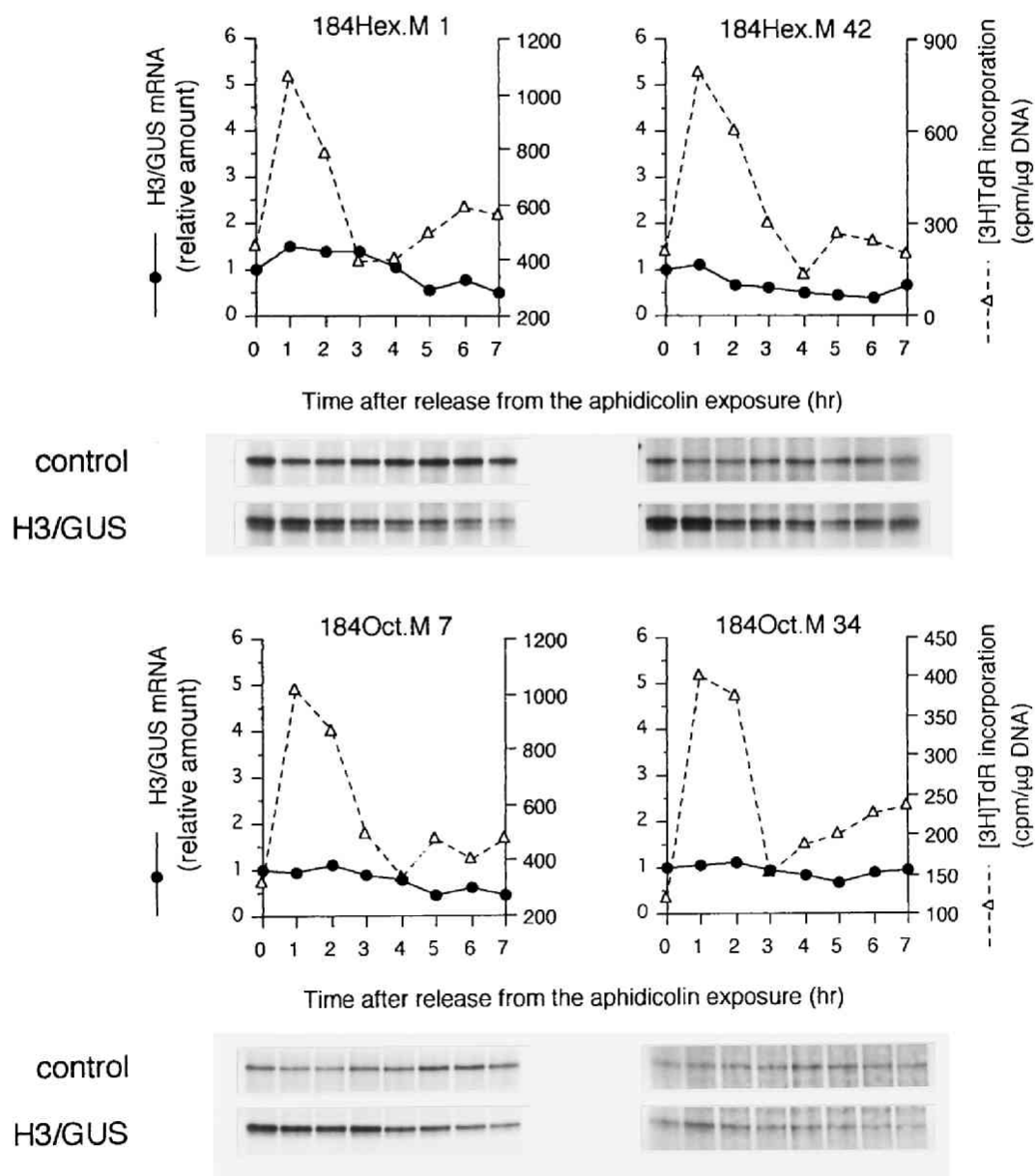


図 15. S1 法による -184H3/GUS 遺伝子及びその変異遺伝子の薬剤除去後の発現パターンの解析 (2) (図の説明は次頁参照)

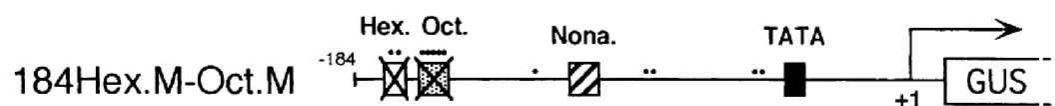
図 15. S1 法による -184H3/GUS 遺伝子及びその変異遺伝子の薬剤除去後の発現パターン解析 (2)

184Hex.M 及び 184Oct.M の 2 種類の H3/GUS キメラ遺伝子について、アフィディコリン除去後の mRNA 量の変動を S1 法を用いて解析した。細胞株 184Hex.M 1 及び 42、184Oct.M 7 及び 34 をそれぞれ用いた。

A: 2 種類の H3/GUS キメラ遺伝子 (184Hex.M, 184Oct.M) のプロモーター領域の模式図。Hex.、Oct.、Nona.、TATA はそれぞれヘキサマー配列、オクタマー配列、ノナマー配列と TATA ボックスを示す。数字は転写開始点 (+1) からの距離、矢印は転写の方向、(●) は塩基置換を導入した位置を表す。1716mod に由来する 5 bp の変異のほかに、184Hex.M では 2 bp の、184Oct.M では 5 bp の変異が導入されている。

B: S1 法による解析。薬剤除去後 0-7 時間で 1 時間ごとにサンプリングし、H3/GUS mRNA 量及びコントロールの Hm' mRNA 量の変動を S1 法により解析した。H3/GUS mRNA 量の変動 (●) は Hm' mRNA 量の変動で補正後、0 時間の値を 1 とした相対値でプロットしてある。また、 $[^3\text{H}]$ チミジンを用いたパルスラベル法で解析した DNA 合成量の変動 (Δ) を同時に示した。DNA 合成量は DNA 1 μg 、1 分間当たりの放射活性を実測値でプロットした。細胞周期の同調化、RNA の調製、S1 法による定量・解析、パルスラベル法の詳細については本文参照。

A



B

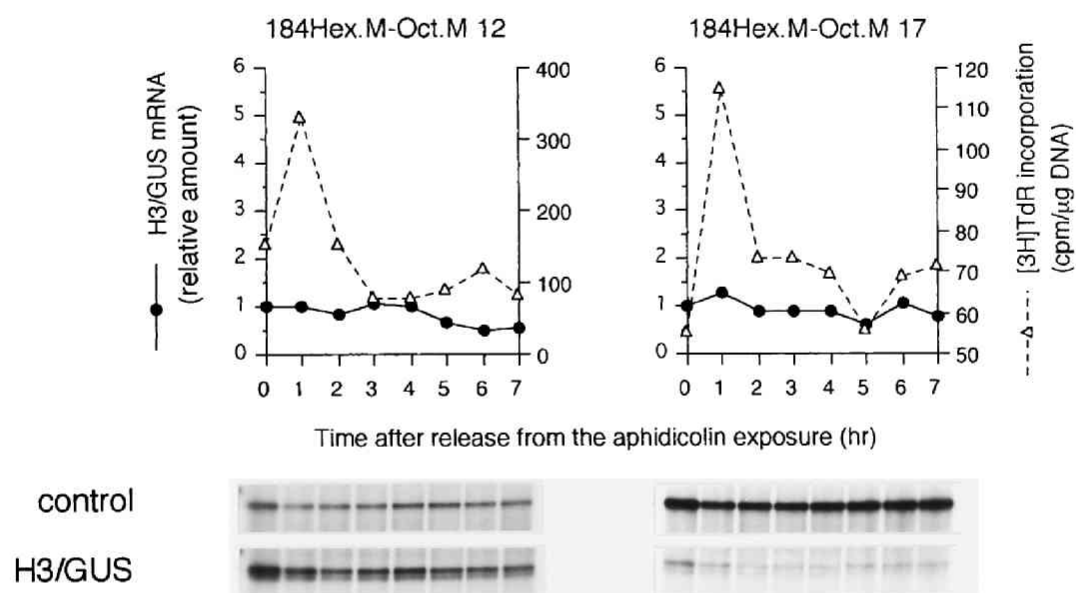


図 16. S1 法による -184H3/GUS 遺伝子及びその変異遺伝子の薬剤除去後の発現パターンの解析 (3) (図の説明は次頁参照)

図 16. S1 法による -184H3/GUS 遺伝子及びその変異遺伝子の薬剤除去後の発現パターン
の解析 (3)

ヘキサマー配列及びオクタマー配列に同時に変異を導入した H3/GUS キメラ遺伝子 184Hex.M-Oct.M について、アフィディコリン除去後の mRNA 量の変動を S1 法を用いて解析した。細胞株 184Hex.M-Oct.M 12 及び 17 をそれぞれ用いた。

A: 184Hex.M-Oct.M のプロモーター領域の模式図。Hex.、Oct.、Nona.、TATA はそれぞれヘキサマー配列、オクタマー配列、ノナマー配列と TATA ボックスを示す。数字は転写開始点 (+1) からの距離、矢印は転写の方向、(●) は塩基置換を導入した位置を表す。1716mod に由来する 5 bp の変異のほかに、ヘキサマー配列には 2 bp、オクタマー配列には 5 bp の変異が導入されている。

B: S1 法による解析。薬剤除去後 0-7 時間で 1 時間ごとにサンプリングし、H3/GUS mRNA 量及びコントロールの Hm' mRNA 量の変動を S1 法により解析した。H3/GUS mRNA 量の変動 (●) は Hm' mRNA 量の変動で補正後、0 時間の値を 1 とした相対値でプロットしてある。また、³H] チミジンを用いたパルスラベル法で解析した DNA 合成量の変動 (△) を同時に示した。DNA 合成量は DNA 1 µg、1 分間当たりの放射活性を実測値でプロットした。細胞周期の同調化、RNA の調製、S1 法による定量・解析、パルスラベル法の詳細については本文参照。

H3 promoter region

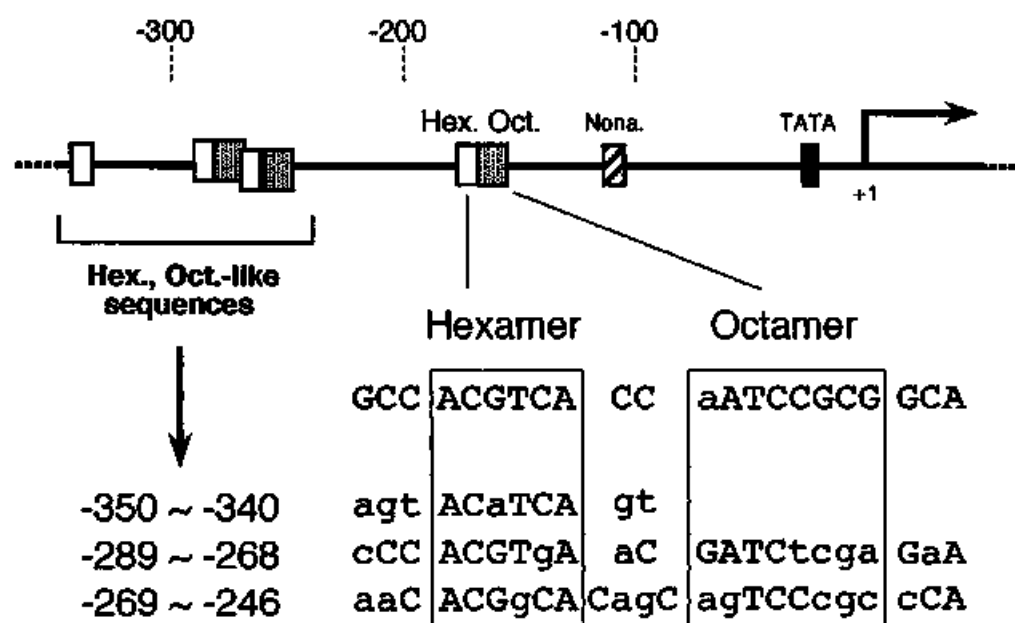


図 17 H3 プロモーター上流域に見られるヘキサマー／オクタマー類似配列

転写開始点上流 350 bp までの H3 プロモーター領域の模式図及びヘキサマー配列、オクタマー配列と上流域に見いだされた類似配列とのホモロジー比較。Hex.、Oct.、Nona.、TATA はそれぞれヘキサマー配列、オクタマー配列、ノナマー配列と TATA ボックスを示す。数字は転写開始点 (+1) からの距離、矢印は転写の方向を示す。上流域の類似配列のうち、ヘキサマー配列、オクタマー配列と一致する残基は大文字で、異なる残基は小文字で示した。H3 プロモーターのオクタマー配列 (AATCCGCG) は、植物ヒストン全体で見たオクタマーの共通配列 (逆向き = GATCCGCG) とは 1 bp 異なる。

H3 promoter region

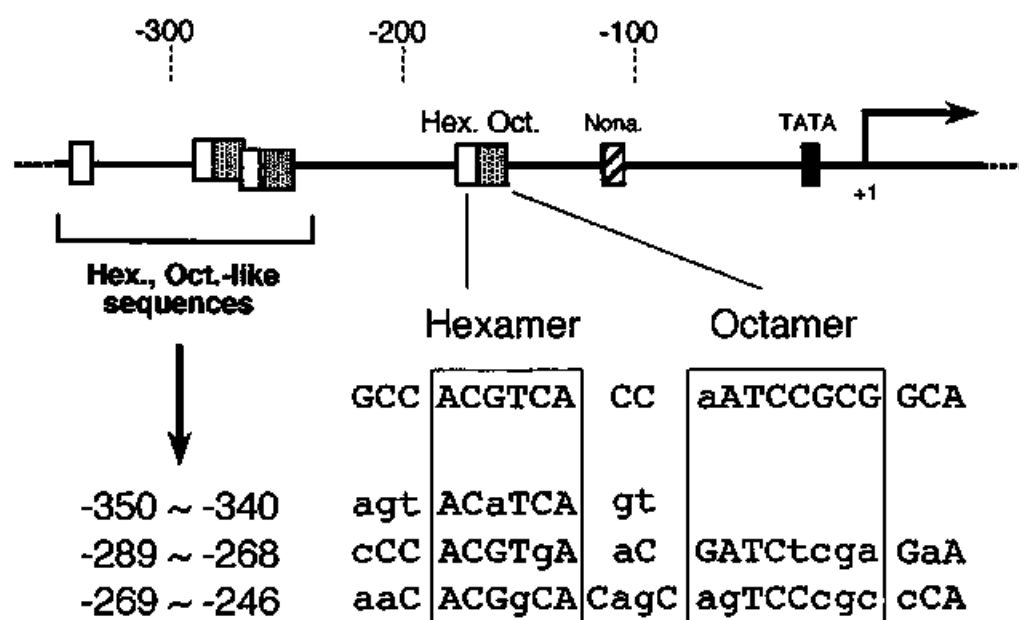


図 17 H3 プロモーター上流域に見られるヘキサマー／オクタマー類似配列

転写開始点上流 350 bp までの H3 プロモーター領域の模式図及びヘキサマー配列、オクタマー配列と上流域に見いだされた類似配列とのホモロジー比較。Hex.、Oct.、Nona.、TATA はそれぞれヘキサマー配列、オクタマー配列、ノナマー配列と TATA ボックスを示す。数字は転写開始点 (+1) からの距離、矢印は転写の方向を示す。上流域の類似配列のうち、ヘキサマー配列、オクタマー配列と一致する残基は大文字で、異なる残基は小文字で示した。H3 プロモーターのオクタマー配列 (AATCCGCG) は、植物ヒストン全体で見たオクタマーの共通配列 (逆向き = GATCCGCG) とは 1 bp 異なる。

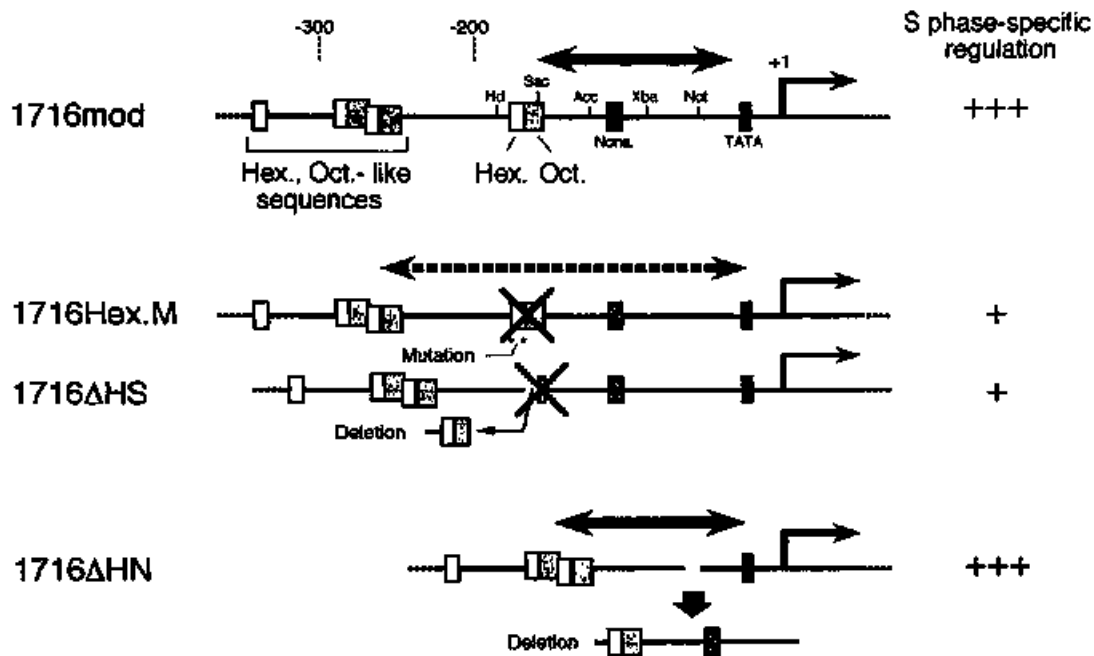
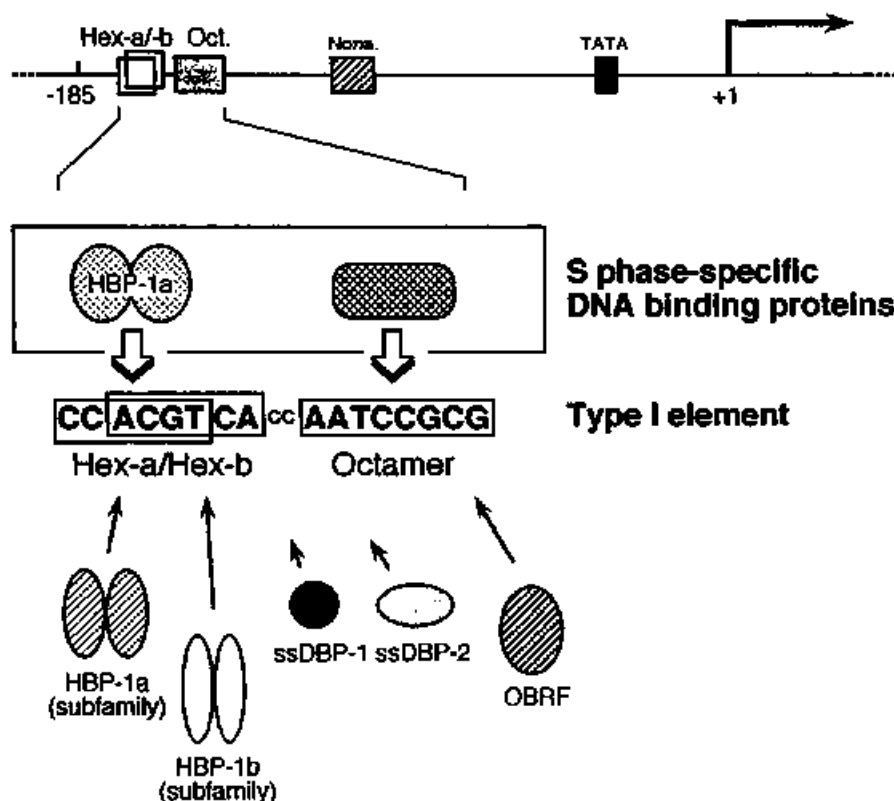


図 18. ヘキサマー／オクタマー類似配列の関与する S 期特異的な転写調節のモデル
 1716mod 及び 3 種類の変異遺伝子 (1716Hex.M, 1716ΔHS, 1716ΔHN; 図 10 及び 11 参照)
 において、導入した変異が遺伝子発現 (転写) に与える効果を転写開始点上流 350 bp までの
 H3 プロモーター領域の模式図とともに示した。Hex.、Oct.、Nona.、TATA はそれぞれヘキサ
 マー配列、オクタマー配列、ノナマー配列と TATA ボックスを示す。数字は転写開始点 (+1)
 からの距離、+1 の矢印は転写の方向を示す。太い両方向の矢印はヘキサマー配列、オクタマ
 ー配列とコア・プロモーターとの S 期特異的な相互作用を表す。実際には TATA-box を中心と
 した基本転写因子の複合体と、ヘキサマー配列及びオクタマー配列に結合する転写因子 (の複
 合体) の相互作用などに対して図のような距離的要因が影響すると予想される。1716Hex.M
 及び 1716ΔHS では上流域のヘキサマー／オクタマー類似配列と転写開始点との距離が大きい
 ため、上流域のヘキサマー／オクタマー類似配列の効果が現れにくい (点線で示した) のに対
 し、1716ΔHN では 123 bp に及ぶ欠失のため、これら類似配列がコア・プロモーターに近づき、
 S 期特異的な転写が回復すると考えられる。

A

H3 promoter region



B

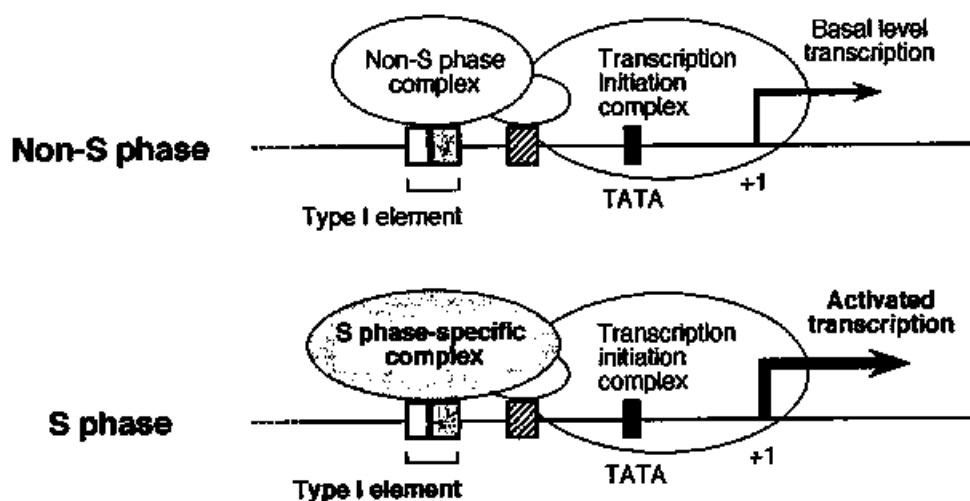


図 19. タイプI・エレメントを介したH3遺伝子のS期特異的な転写調節のモデル
(図の説明は次頁参照)

図 19. タイプ I・エレメントを介した H3 遺伝子の S 期特異的な転写調節のモデル

A: ヘキサマー配列及びオクタマー配列を含むタイプ I・エレメント (表 3 参照) と、ここに結合する蛋白因子。最近新たに見いだされた S 期特異的な結合活性を示す核蛋白質も含めて示した。これらによって遺伝子発現の S 期特異性が規定されるものと考えられる。Hex-a/b、Oct、Nona、TATA はそれぞれ Hex-a モチーフ及び Hex-b モチーフ (ヘキサマー配列)、オクタマー配列、ノナマー配列と TATA ボックスを示す。数字は転写開始点 (+1) からの距離、+1 の矢印は転写の方向を示す。

B: S 期特異的な転写活性化のモデル。S 期における H3/GUS mRNA 量の急激な増加は主にタイプ I・エレメントを介した転写の活性化によるものと考えられる。この S 期特異的な活性化は、ここに結合する核蛋白因子それぞれの存在量の変動や、構造の変化 (リン酸化等) などを含めた最終的な複合体構成の変化によって引き起こされるものと考えている。